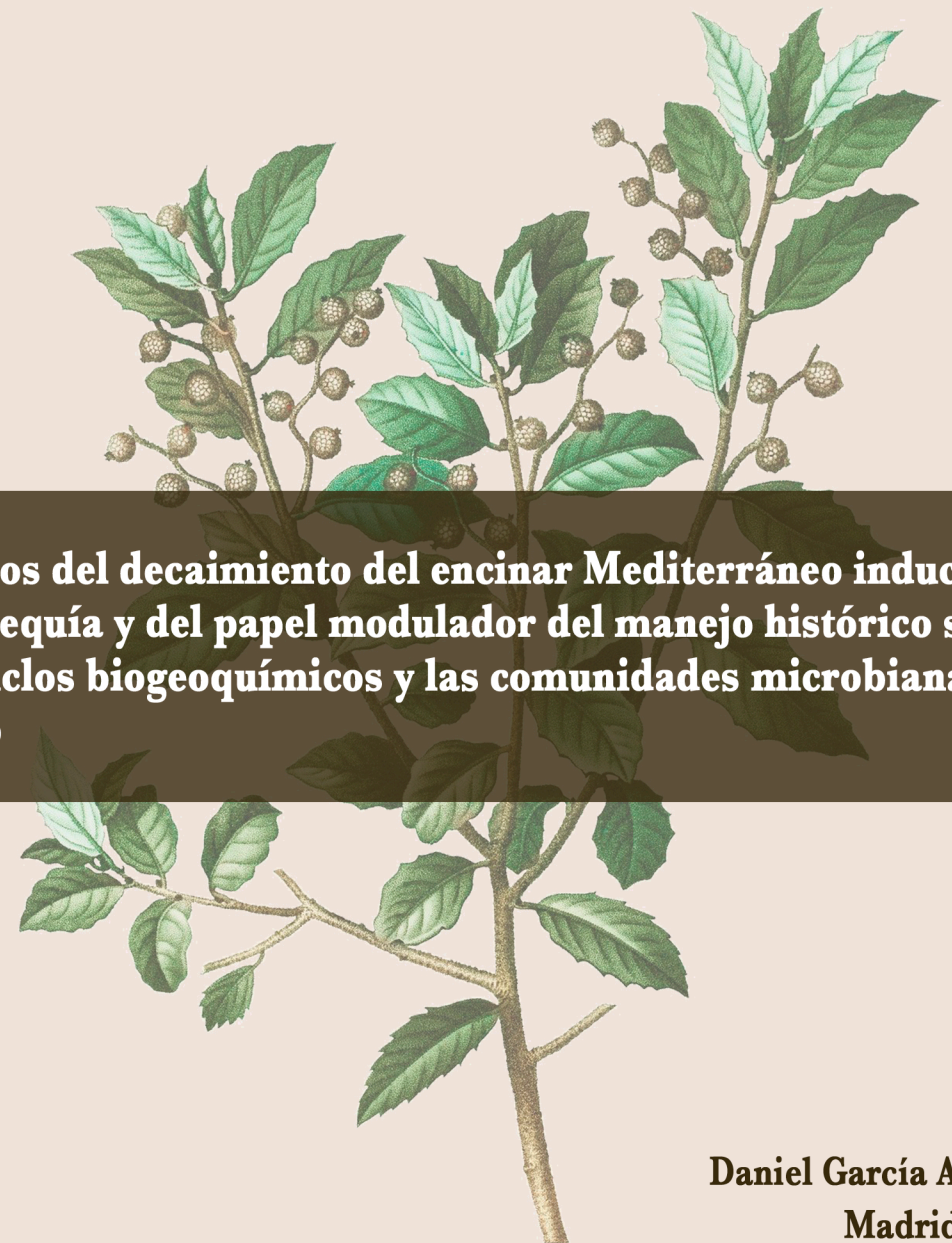




TESIS DOCTORAL · Daniel García Angulo · 2020

· TESIS DOCTORAL ·

**Efectos del decaimiento del encinar Mediterráneo inducido por sequía y del papel modulador del manejo histórico sobre los ciclos biogeoquímicos y las comunidades microbianas del suelo**



Daniel García Angulo  
Madrid, 2020





**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**Facultad de Ciencias**

**Departamento de Biología**

**Museo Nacional de Ciencias Naturales**

**&**

**Basque Center for Climate Change**

**Efectos del decaimiento del encinar Mediterráneo inducido por sequía y del papel modulador del manejo histórico sobre los ciclos biogeoquímicos y las comunidades microbianas del suelo**

**Effects of drought-induced decline in Mediterranean Holm oak and the modulating role of land-use on soil biogeochemical cycles and soil microbial communities**

**TESIS DOCTORAL**

**DANIEL GARCÍA ANGULO**

**Licenciado en Biología**

**Directores:**

**Jorge Curiel Yuste**

**Manuel Fernández López**

**Tutor:**

**Javier Lloret Romero**

**Madrid, 2020**

Esta tesis ha sido realizada en el departamento de Biogeografía y Cambio Global del Museo Nacional de Ciencias Naturales (Consejo Superior de Investigaciones Científicas) y en el Grupo de Ecología Terrestre del Basque Center for Climate Change (BC3), gracias a la concesión de una beca predoctoral de Formación al Personal Investigador (FPI), BES-2014-067971, por parte del Ministerio de Economía, Industria y Competitividad. Los estudios llevados a cabo en esta tesis han sido financiados por el proyecto VErONICA (Vulnerability of Mediterranean Holm-Oak forests to Climate Change: Mechanisms and impact of historical management on ecosystem services; CGL2013-42271-P) y el proyecto IBERYCA (The role of plant-microBiota Interactions in the Resilience and Collapse of Mediterranean holm oAks; CGL2017-84723-P), ambos concedidos por el programa estatal de fomento de la investigación científica y técnica de excelencia del Ministerio de Economía, Industria y Competitividad.



Dr. Jorge Curiel Yuste, Profesor de Investigación Ikerbasque del Basque Center for Climate Change (BC3) y Dr. Manuel Fernández López, Científico Titular de la Estación Experimental del Zaidín (Consejo Superior de investigaciones Científicas),

Certifican:

Que la Tesis Doctoral titulada “Efectos del decaimiento del encinar Mediterráneo inducido por sequía y del papel modulador del manejo histórico sobre los ciclos biogeoquímicos y las comunidades microbianas del suelo” presentada por D. Daniel García Angulo, Licenciado en Biología por la Universidad Complutense de Madrid, ha sido realizada bajo su dirección en el departamento de Biogeografía y Cambio Global del Museo Nacional de Ciencias Naturales (Consejo Superior de Investigaciones Científicas) y en el Grupo de Ecología Terrestre del Basque Center for Climate Change (BC3), cumpliendo los requisitos exigidos por la legislación vigente para optar al grado de Doctor.

De acuerdo con lo expuesto, firman este certificado, autorizando a su autorización y defensa, a 1 de marzo de 2020.

Jorge Curiel Yuste

Director

Manuel Fernández López

Codirector



*A mis padres, hermana y  
pareja*

*A los que, aún no pudiendo estar,  
me apoyaron siempre*

## Agradecimientos

Al fin ha llegado el día de terminar una de las etapas más largas y difíciles de mi vida. Cinco años han pasado desde el día que empecé esta aventura, la cual ha tenido desde momentos inolvidables hasta momentos que ya han pasado al olvido. En este pequeño hueco de mi tesis doctoral, me gustaría mostrar mi agradecimiento a todas aquellas personas que me han ayudado y apoyado durante este viaje. Sin embargo, perdóname de antemano si en el momento de terminar de leer estas palabras, te has percatado de que no te he mencionado, no creas que ha sido por tu falta de apoyo, sino por mi carencia de lucidez en este gran día, último día de escritura de esta tesis doctoral.

En primer lugar, me gustaría agradecer la oportunidad que me ha dado Jorge de realizar este doctorado bajo su tutela, muchos años han pasado ya desde que me acogiera en el Museo Nacional de Ciencias Naturales como su estudiante en mi trabajo de fin de máster, para que, al finalizar me ofreciera esta gran y única oportunidad. Por esto y todo lo que me ha enseñado durante el transcurso de los años, sólo puedo decir muchas gracias. Del mismo modo, gracias, Manolo, por enseñarme las herramientas necesarias y ayudarme en el desarrollo de este gran trabajo que en estos días está llegando a su final.

Del mismo modo que a mis directores, sólo puedo tener palabras de agradecimiento hacia mi familia. Muchísimas gracias a mis padres por el apoyo que me habéis dado durante estos años aguantando mis charlas sobre la tesis y no dejándome abandonarla nunca. A mi hermana, que, aunque hablemos poco siempre estamos preguntando a los intermediarios (nuestros padres) sobre cómo nos va la vida, gracias por estar ahí. Como parte de mi familia también he de decir, muchísimas gracias a mi pareja, Virginia, por todo lo que ha tenido que aguantar durante este tiempo: mi temperamento, los fines de semana de trabajo, las vacaciones perdidas...pero nunca ha dejado de apoyarme y estar a mi lado. A la nueva incorporación de la casa, Kora, por acompañarme siempre en estos momentos difíciles de escritura. Agradecer también a Rubén, por todas las horas de entretenimiento que hemos pasado, ayudándome a sobrellevar este arduo trabajo; así como a Raquel, por siempre preguntar sobre cómo estaba y tenderme una mano por si lo necesitaba.



## AGRADECIMIENTOS

Agradecer también a la planta octava, donde tanto tiempo pasé realizando esta tesis. A Ana María Hereş, por todos los buenos momentos que hemos pasado tanto dentro como fuera de la oficina. A Omar Flores, por ser uno de los mejores compañeros que nadie puede desear. A Alicia Forner, por su gran ayuda cuando cualquier cosa se desbarataba por la oficina. A Cristina Crespo, por la alegría que aportaba cuando muchos no podíamos ver la salida. A Bárbara Carvalho, por esas lecciones inolvidables de castellano. A David López, por su grandísima ayuda en el muestreo y cualquier duda que surgía en el laboratorio. A Miguel Fernández, por aquellos viajes de muestreo hacia los rincones de la misteriosa España. A Fernando Valladares, por su gran temple científico y todas las clases de retórica que nos regaló. A Mario Díaz, por su contribución cuando estaba estancado en los análisis. A Xandra Rodríguez y a Jorge Durán, por su gran ayuda desde el primer día que entré en el laboratorio. Muchas gracias también a toda la gente con la que me crucé durante mi estancia en el Museo, sin la cual no hubiera sido posible realizar esta tesis doctoral: Dulce Flores, Paula Gil, Raquel Benavides, Elena Concepción, Teresa Morán, Ciro Cabal, Sandra Magro, Ana Rey, Asunción de los Ríos, Matheus Maza, Guido Pellis, Octavio Cedenilla, Mikel Calle, Cristina Casero, Sonia Novella, Andrea Orejarena, Marta Ramos...

También agradecer a toda la gente que he conocido y me ha ayudado durante mis estancias en el extranjero. En especial, a Ana Martín por ser una de las mejores tutoras que he tenido nunca; y a Marta Gil, por tener la gran suerte de encontrarnos siempre en todos los eventos a los que acudimos. Sin olvidarme de las estancias nacionales de Granada, donde guardo un especial cariño a Ana Lasa y Antonio José Fernández, por toda la ayuda y apoyo que me han prestado durante estos años.

Además, y volviendo a mis orígenes, me gustaría agradecer a todos mis amigos mirandeses por haberme aguantado durante todo este tiempo. A Nacho y Xenia por todas las tardes de Catán, Ciudadelas, Carcassonne...A Gonzalo, que, a pesar de sus preguntas sobre el valor de este documento, siempre me apoyaba. A la familia Campillo, por su apoyo y cariño. A Adrián, por esa curiosidad hacia lo que estaba haciendo que tan poca gente tenía. A mi gran amigo Borja, que, aunque desde la distancia, siempre encontramos algún hueco al año para reunirnos; así como, a mi primo Rodrigo por su interés y apoyo durante estos años.

También he de agradecer a todos los amigos de la carrera y máster que me han acompañado en este gran viaje. A Guillermo, que, a pesar de su difícil calendario

## AGRADECIMIENTOS

siempre sacaba algún hueco para echar unas partidas. Al Dr. Larraga, por su grandísima ayuda durante estos últimos meses y su gran paciencia hacia mi persona. Al 99%-Dr. Avanzao, por nuestras grandes conversaciones y compartir nuestra pasión hacia lo ambiental. A Juan, por sus grandes descubrimientos en Youtube y estar siempre dispuesto a ayudar. A Bea, por ser la mama pato del grupo y poder manejar a los anteriormente mencionados. A Kiko y Tamara, por ser parte de este gran grupo y por su apoyo y ayuda.

Por último, también agradecer a los grandes compañeros y amigos que he hecho durante el bootcamp. En especial, al equipo Iberia, por nuestras largas tardes/noches trabajando. Y al equipo MRM/McCann, por su gran apoyo y cariño. Del mismo modo, tengo que agradecer al director de dicho bootcamp, Iván, por sus enseñanzas y guiarme hacia un nuevo camino. De este modo, agradecer también a todos los compañeros de Binfluencer por haberme tenido que aguantar durante estos últimos meses.

De nuevo, a todos vosotros, solo os puedo decir:

**Muchísimas gracias**

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>3</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>5</b>
<b>El cambio climático y su impacto en los ecosistemas</b>	<b>7</b>
<b>El encinar mediterráneo en el contexto de cambio climático</b>	<b>11</b>
El encinar mediterráneo	11
Manejo histórico de los encinares mediterráneo	12
Efecto del cambio climático en los encinares mediterráneos (La Seca)	14
<b>El papel de la interacción planta – suelo en el contexto de cambio climático y decaimiento forestal</b>	<b>15</b>
El papel de las interacciones planta-suelo en los ciclos biogeoquímicos	17
Ciclo del Carbono	17
Ciclo del Nitrógeno	20
Efecto del manejo histórico de las encinas en el ecosistema suelo	21
Efecto del cambio climático y el decaimiento forestal en los ciclos biogeoquímicos y las comunidades microbianas del suelo	23
<b>OBJETIVOS</b>	<b>25</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>29</b>
<b>Área de estudio</b>	<b>31</b>
Manejo histórico de las zonas de muestreo	31
Diseño experimental	34
Descripción de las zonas de muestreo	34
Climatología de los sitios de muestreo	37
Recogida de muestras de suelo	37



<b>Análisis físico – químico de las muestras de suelo</b>	<b>38</b>
Mineralización del Carbono y Nitrógeno del suelo	40
Mineralización del Carbono	40
Mineralización del Nitrógeno	41
Cálculo de la biomasa microbiana (método SIR)	42
<b>Extracción de ADN de las muestras de suelo</b>	<b>43</b>
Extracción de ADN	43
Electroforesis en geles de agarosa	45
Cuantificación de la concentración de ADN	45
<b>Amplificación del ADN</b>	<b>45</b>
<b>Análisis bioinformático</b>	<b>46</b>
Comprobación de la calidad de lecturas mediante FastQC	47
Solapamiento de los archivos FastQ	48
Procesamiento de las secuencias solapadas con Qiime 1.9.1	48
Extracción de los cebadores de las muestras solapadas	48
Comprobación de la calidad de las muestras	49
Identificación y eliminación de las secuencias quimera	49
Clustering de los datos metagenómicos y asignación de OTUs.	50
Análisis de las comunidades microbianas del suelo	51
Pre-procesado de las muestras microbianas del suelo	51
Asignación de los gremios fúngicos	52
Diversidad de las comunidades microbianas del suelo	52
Abundancia Relativa de las comunidades del suelo	55
Valor indicador (IndVal) de las comunidades microbianas	55
Core community de las comunidades microbianas del suelo	56
Redes de co-ocurrencia de las comunidades microbianas del suelo	56
<b>Estadística</b>	<b>59</b>
Análisis de varianza (ANOVA)	59
Modelos lineales mixtos	60
Modelos de ecuaciones estructurales (SEM)	61

**CAPÍTULO 1: TREE MORTALITY EXACERBATED CLIMATE-INDUCED CHANGES IN  
SOIL STOICHIOMETRY AND SOIL NUTRIENT CYCLING 63**

<b>Summary</b>	<b>65</b>
<b>Introduction</b>	<b>66</b>
<b>Materials and methods</b>	<b>68</b>
<b>Results</b>	<b>71</b>
<b>Discussion</b>	<b>77</b>
<b>Conclusions</b>	<b>80</b>

**CAPÍTULO 2: LAND-USE INTENSITY MODULATE THE SENSITIVITY AND  
RECOVERY OF SOIL CORE MICROBIAL COMMUNITIES IN MEDITERRANEAN  
HOLM OAKS 81**

<b>Summary</b>	<b>83</b>
<b>Introduction</b>	<b>84</b>
<b>Material and methods</b>	<b>86</b>
<b>Results</b>	<b>89</b>
<b>Discussion</b>	<b>97</b>
<b>Conclusions</b>	<b>102</b>
<b>Supplementary material</b>	<b>103</b>

**CAPÍTULO 3: LAND-USE MODULATES SOIL BACTERIAL AND FUNGAL DIVERSITY  
AFTER DROUGHT-INDUCED DECLINE IN HOLM-OAK MEDITERRANEAN  
ECOSYSTEMS 113**

<b>Summary</b>	<b>115</b>
----------------	------------

<b>Introduction</b>	<b>116</b>
<b>Material and methods</b>	<b>118</b>
<b>Results</b>	<b>120</b>
<b>Discussion</b>	<b>127</b>
<b>Conclusions</b>	<b>130</b>
<b>Supplementary material</b>	<b>131</b>
<b>DISCUSIÓN GLOBAL</b>	<b>133</b>
<b>CONCLUSIONES GENERALES</b>	<b>143</b>
<b>GENERAL CONCLUSIONS</b>	<b>147</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>151</b>



## Abreviaturas

% Cc ha<sup>-1</sup>. Porcentaje de defoliación por hectárea

1/D. Índice de Simpson inverso

ADN. Ácido desoxirribonucleico

AIC. Criterio de información de Akaike

ANOVA. Análisis de varianza

ARN. Ácido ribonucleico

<sub>Av</sub>P. Fósforo biodisponible

BC. Centralidad de enmediedad

bp. Pares de bases

C. Carbono

Ca<sup>2+</sup>. Calcio

CaCO<sub>3</sub>. Carbonato cálcico

CH<sub>4</sub>. Metano

cm. Centímetros

CO<sub>2</sub>. Dióxido de carbono

COS. Carbono orgánico en el suelo

DBH. Diámetro a la altura del pecho

Defol. Defoliación de la copa del árbol

DH. Dehesa

DNA. Ácido desoxirribonucleico (denominación en inglés)

ECM. Ectomicorrizas

EGM-4. Analizador de gases en el infrarrojo

FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

FR. Bosques

g. Gramos

GEI. Gases de efecto invernadero

H'. Índice de Shannon

ha. Hectárea

ICA – CSIC. Instituto de Ciencias Agrarias

IFN3. Inventario Forestal Nacional

J'. Índice de equidad de Pielou

K<sup>+</sup>. Potasio

km. Kilómetro

LME. Modelos lineales mixtos  
m<sup>2</sup>. Metro cuadrado  
MAP. Precipitación media anual  
MAT. Temperatura media anual  
Mg<sup>+</sup>. Magnesio  
mL. Mililitro  
mm. Milímetros  
MOS. Materia orgánica del suelo  
MSU. Michigan State University  
N. Nitrógeno  
N<sub>2</sub>. Nitrógeno atmosférico molecular  
N<sub>2</sub>O. Óxido nitroso, Óxido nitroso  
Na<sup>+</sup>. Sodio  
ND. Centralidad de Grado  
ng. Nanogramo  
NH<sub>4</sub><sup>+</sup> - N. Amonio  
NMDS. Non-metric Multidimensional Scaling  
NO<sub>3</sub><sup>-</sup> - N. Nitrato  
NOAA. National Oceanic and Atmospheric Administration  
N-prok. Nitro-prokaryote  
°C. Grados centígrados  
OTUs. Unidades Taxonómicas Operacionales  
OW. Bosques abiertos  
P. Fósforo  
PANDAsq. PAired-eND Assembler for DNA sequences  
PCA. Análisis de componentes principales  
PCR. Reacción en cadena de la polimerasa  
PERMANOVA. Análisis permutacional de la varianza  
ppb. Partes por billón  
ppm. Partes por millón  
Q. Ilex. *Quercus Ilex* (encina)  
R1. Forward primer  
R2. Reverse primer  
R<sub>amm</sub>. Amonificación neta  
RDP. Ribosomal Database Project (<https://rdp.cme.msu.edu/>)

R<sub>H</sub>. Respiración heterotrófica del suelo

R<sub>nit</sub>. Nitrificación neta

rpm. Revoluciones por minuto

RTA. Real Time Analysis

SEM. Modelos de ecuaciones estructurales

SignA. Sistema de Información Geográfica Nacional

SIR. Respiración inducida por sustrato

SOC. Carbono orgánico del suelo (denominación en inglés)

SOM. Materia orgánica del suelo (denominación en inglés)

SPEI. Índice estandarizado de precipitación-evapotranspiración

Spiec-Easi. Sparse Inverse Covariance estimation for Ecological Association and  
Statistical Inference

T inf. Influencia del árbol

VAI. Vegetation area index

VIF. Factor de inflación de la varianza

WHC. Capacidad de retención de agua

µg. Microgramo

µl. Microlitros



**RESUMEN**

El incremento de la frecuencia e intensidad de las sequías durante las últimas décadas ha provocado que especies arbóreas tan resilientes a condiciones climáticas extremas como la encina (*Quercus ilex* subs. *ballota*) se hayan visto afectadas por fenómenos de decaimiento. Este decaimiento del encinar (denominado “La Seca” en España) se caracteriza por producir una pérdida de vigor en las especies arbóreas, pudiendo provocar desde el marchitamiento y defoliación de las hojas, hasta la muerte del árbol. Asimismo, el decaimiento del encinar puede alterar las dinámicas de carbono (C) y nutrientes del suelo, ya que, mientras el árbol sufre el proceso de defoliación, incrementará la cantidad de materia orgánica en el suelo, pero una vez el árbol muera, este aporte se verá reducido drásticamente. En este contexto, es importante comprender como el manejo histórico al que se ha sometido la encina puede modular el efecto del decaimiento sobre el sustrato arbóreo y sobre el funcionamiento y biodiversidad del ecosistema suelo. En esta tesis doctoral, se ha llevado a cabo el estudio de los efectos del decaimiento de la encina en los ciclos biogeoquímicos del suelo y en las comunidades microbianas del mismo en tres manejos diferentes (bosques, bosques abiertos y dehesas) a lo largo de la Península Ibérica. Para esto, realizamos el análisis de los nutrientes del suelo, de la respiración aeróbica microbiana (respiración heterotrófica,  $R_H$ ), de la mineralización del nitrógeno (N) y de la diversidad taxonómica (*metabarcoding* del ADN) de los microorganismos del suelo (hongos y bacterias) bajo la influencia de encinas con 3 tipos diferentes de salubridad (encinas sanas, defoliadas y muertas). Los resultados obtenidos mostraron que el ciclado de C y nutrientes del suelo se ven afectados por el decaimiento independientemente del manejo histórico al que la encina está sometida, exacerbando en muchos casos el efecto directo del clima. En este sentido, el decaimiento del encinar provoca una cascada de relaciones causa-efecto que promueve cambios en la abundancia de algunos grupos funcionales microbianos (ej. Incremento de las bacterias nitrificadores y disminución de los hongos ectomicorrícicos) produciendo la acumulación de nutrientes móviles (ej. nitrato y fósforo disponible) en el suelo. Por otro lado, el manejo histórico del encinar modula la diversidad y estructura en el núcleo de las comunidades microbianas del suelo, definido como las Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs) con al menos 400 lecturas para las bacterias y 200 lecturas para los hongos y detectadas en al menos tres localizaciones diferentes para cada manejo histórico. Por consiguiente, el manejo del encinar modula la sensibilidad del núcleo de las comunidades microbianas a las variables ambientales (clima y pH) o al estado

## RESUMEN

nutricional del suelo: el núcleo de la comunidad de los sistemas más manejados (dehesas) era más sensible a la variabilidad climática mientras las comunidades encontradas bajo doseles más densos (bosques) fueron más sensibles la variabilidad en la disponibilidad de nutrientes. Nuestros resultados también muestran como el abandono del manejo de las dehesas y la recuperación gradual del sustrato arbóreo observado en los bosques abiertos resultó en una recuperación en paralelo del núcleo de la comunidad microbiana, mostrando una microbiota más similar a la encontrada en los ecosistemas naturales de bosque. Estos resultados revelan la gran resiliencia por parte de las comunidades microbianas del suelo al abandono de sistemas tan manejados como las dehesas. Asimismo, el manejo histórico también modula la respuesta/resiliencia de las comunidades microbianas del suelo tras las perturbaciones asociadas con la mortalidad del árbol. En este sentido, los bosques mostraron una comunidad fúngica muy resiliente con el decaimiento lo que les conferirá una mejor capacidad de recuperación frente a este tipo de perturbaciones; mientras que, las dehesas presentaron una comunidad bacteriana menos alterada probablemente debido a la mayor colonización por parte del sustrato herbáceo en estos espacios más abiertos. Por lo tanto, el decaimiento del encinar parece variar sus efectos en el ecosistema suelo según el manejo histórico al que se vea sometido, mostrando signos de recuperación en los sistemas más densos y naturales. En este sentido, los resultados obtenidos ponen de manifiesto la gran importancia del manejo histórico para la conservación de la diversidad y funcionamiento del ecosistema suelo; así como, la repercusión que puede tener el cambio climático, a través del decaimiento forestal, en los sistemas de encinar.

## SUMMARY

The increase in the frequency and intensity of droughts during the last decades has affected even to tree species adapted to drought, such as Holm oak (*Quercus ilex* subs. *ballota*). Holm oak decline (denominated as “La Seca” in Spain) is characterized by the loss of tree vigor, causing wilting of the leaves, tree defoliation and ultimately the death of the tree. Furthermore, Holm oak decline is going to alter soil C (C) and nutrients dynamics since tree defoliation will increase soil litter while happening and decrease once the tree dies. In this context, it is important to understand how the different historical land-uses to which Holm oaks has been subjected can modulate the effect of Holm-oak decline on the tree layer and on the functioning and biodiversity of the soil system. In this dissertation, we conducted a regional study on the effects of Holm oak decline over soil carbon and nutrient cycling, and taxonomic diversity and functioning of soil microbial communities in three different land-uses (forests, open woodlands and dehesas) along the Iberian Peninsula. For this, soil nutrient content, microbial aerobic respiration (heterotrophic respiration,  $R_H$ ), nitrogen (N) mineralization, as well as soil microbial (fungal and bacterial) taxonomic diversity (DNA metabarcoding) were measured under the influence of Holm oaks trees with three different health status (healthy, defoliated and dead). The results obtained showed that soil C and nutrient cycling were affected by drought-induced decline regardless the land-use to which Holm oaks were subjected, exacerbating in many cases the direct effect of climate. In this sense, Holm oak decline causes a cascade of causal-effects relations that promotes changes in the abundance of some soil microbial functional groups (e.g. increases in nitrifiers bacteria and decreases in ectomycorrhizal fungi) resulting in the net accumulation of mobile mineral forms of essential nutrients (e.g. nitrate and available phosphorus) in soil. On the other hand, land-use modulated the diversity and structure of the core community of soil microorganisms, defined as the Operational Taxonomics Units (OTUs) with at least of 400 reads (for bacteria) and 200 reads (for fungi) and detected in at least three different locations for each land-use. Hence, land-use modulated the sensitivity of the core microbial community to the abiotic environment (climate and pH) or to the nutritional status of soil: core communities in more intensively managed systems (dehesas) were more sensitive to climatic variability whereas those under denser canopies (forest) were more sensitive to variability in nutrient availability. Our results also show how the abandonment of the management in dehesas and subsequent gradual recovery of the aboveground forest structure observed in open woodlands resulted in a parallel recovery of the soil

## SUMMARY

microbial core community, showing a microbiota more similar to that found in natural ecosystems, as forests. These results reveal how resilient soil microbial communities are after the abandonment of agroecosystems. Moreover, land-use also modulate the responses/resilience of soil microbial communities after the perturbations associated with tree mortality. In this sense, forests showed a very resilient fungal community with Holm oak decline, which will give them a better capacity to recover after this type of perturbances; while, dehesas presented a less altered bacterial community probable due to the greater colonization by the herbaceous substrate. Therefore, Holm oak decline seems to vary its effects on soil ecosystems according to the historical land-use to which it is subjected, showing clear signs of recovery in the more dense and natural systems. In this sense, the results obtained show the huge impact of historical land-use for the conservation of the diversity and functioning of soil ecosystems; as well as the importance on the understanding of climate change effects, through drought-induce decline, on holm oak ecosystems.

# **INTRODUCCIÓN**

## El cambio climático y su impacto en los ecosistemas

En las últimas décadas, la comunidad científica ha puesto el foco en el cambio climático como una de las grandes crisis a las que el planeta tiene que hacer frente (Crowley, 2000; Christensen et al., 2013; Hirabayashi et al., 2013; IPCC, 2014; Huang et al., 2016; Kellogg and Schware, 2019). Los cambios en el clima pueden producirse de forma natural, debido por ejemplo a la erupción de volcanes (Robock, 2000) y/o a variaciones históricas en las concentraciones de gases de efecto invernadero (GEI), gases cuya concentración bajo condiciones naturales mantiene la temperatura de la troposfera en unos rangos de habitabilidad para los seres vivos (Mitchell, 1989). Sin embargo, los cambios en el clima, como los que se están experimentando en el presente, se deben en gran medida a cambios en las concentraciones de GEI fruto de la actividad industrial y la producción de cemento (IPCC, 2014). Desde la revolución industrial, las emisiones de GEI como el dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), vapor de agua, metano, óxido nitroso, ozono y clorofluorocarbonos se ha incrementado de manera exponencial debido al uso desmesurado de los combustibles fósiles (Crowley, 2000; IPCC, 2014). Por ejemplo, el incremento de las emisiones de  $\text{CO}_2$  hacia la atmósfera fruto de la actividad antropogénica, ha incrementado sus concentraciones atmosféricas desde las 340 partes por millón (ppm) registrados en 1980 hasta los 411 ppm registrados en 2019. (National Oceanic and Atmospheric Administration - NOAA, <https://www.esrl.noaa.gov/>). Por otro lado, la NOAA también ha mantenido un registro de los niveles de otros gases de efecto invernadero, como el metano ( $\text{CH}_4$ ) o el óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ), donde ha encontrado una tendencia similar a la del  $\text{CO}_2$  con un incremento en sus emisiones de 100 y 16 partes por billón (ppb), respectivamente, desde el año 2000 hasta la actualidad. Este aumento en la concentración de GEI ha sido directamente asociado al incremento de la temperatura global del planeta, produciéndose el llamado calentamiento global (IPCC, 2014). Este calentamiento global tiene una serie de consecuencias a diferentes escalas, pudiendo provocar desde un cambio hidrológico global hasta una disminución de los recursos naturales a nivel local. Los cambios hidrológicos globales se deben, principalmente, al deshielo de los glaciares (Gregory and Oerlemans, 1998; Mitrovica et al., 2001), lo que provoca un aumento en los niveles del agua y cambios en su salinidad, salinizando acuíferos terrestres y reduciendo enormemente la cantidad de agua dulce disponible (Oki and Kanae, 2006; Chui and Terry, 2013). Por otro lado, también podría afectar a la corriente del Golfo, cambiando por completo la temperatura global del planeta y afectando de este modo a la climatología de continentes enteros (Chen and Tung, 2018).

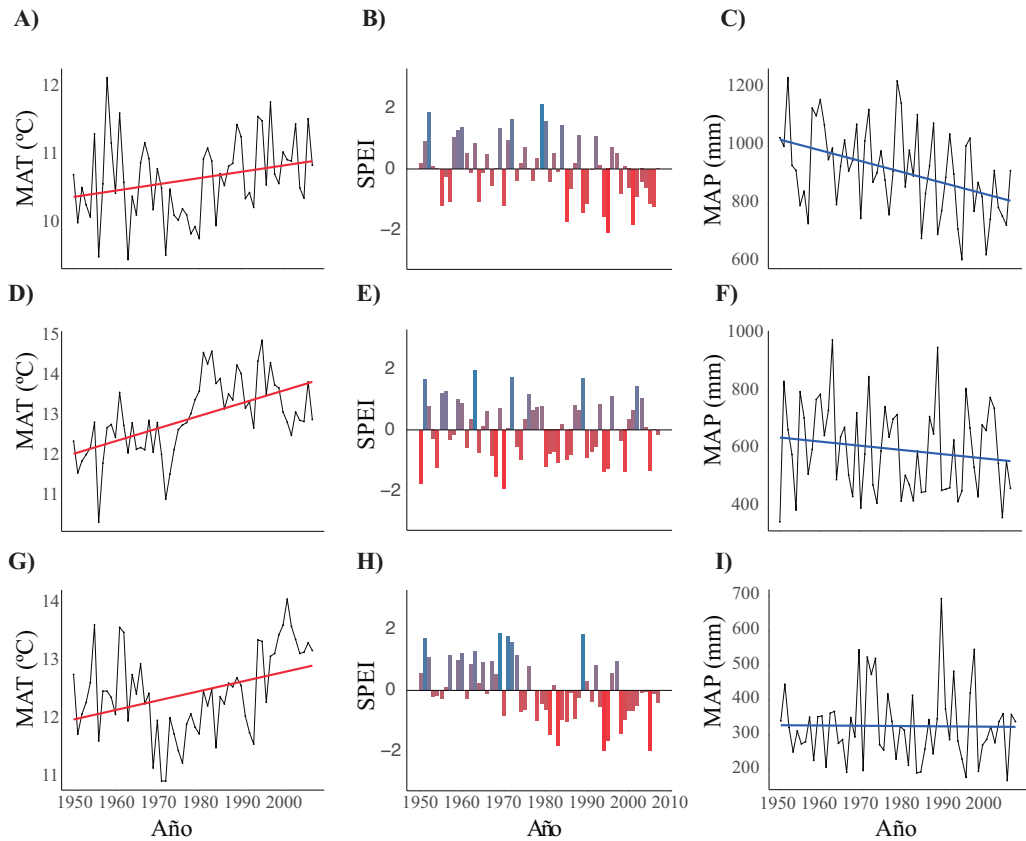
## INTRODUCCIÓN

El cambio climático, además de estar asociado al aumento en la temperatura global, también está relacionado a cambios en los patrones de precipitación, reflejado en periodos de sequías más abundantes y extendidos en el tiempo, así como a unos eventos de precipitación más extremos, lo que conllevará a un aumento en la aridez de los ecosistemas terrestres acompañado de grandes y puntuales inundaciones (IPCC, 2014; Mariotti et al., 2015). La American Meteorological Society (2012) define la aridez como el “grado en que un clima carece de humedad efectiva capaz de promover la vida en un ecosistema”, por lo que, un incremento en la frecuencia e intensidad de las sequías, producirá una disminución en la disponibilidad de agua dulce por parte del ecosistema.

En este sentido, los bosques han mostrado una enorme sensibilidad a estos cambios en los patrones de precipitación. Los desequilibrios causados por los fenómenos de sequía pueden provocar que especies forestales en los bordes de su rango de distribución alcancen su umbral climático, lo que, en última instancia, puede producir un cambio poblacional a favor de especies forestales más adaptadas (Allen and Breshears, 1998; Castro et al., 2004; Vilà-Cabrera et al., 2013; Carnicer et al., 2014). Por ejemplo, en la Península Ibérica, las especies de pino están siendo desplazadas y remplazadas por especies más resilientes a estos cambios climáticos, como las especies del género *Quercus* (Carnicer et al., 2014). Sin embargo, si las sequías se mantienen durante un periodo de tiempo elevado, incluso las especies forestales más adaptadas pueden mostrar signos de vulnerabilidad a las deficiencias hídricas a las que están sometidas (Avila et al., 2016; Gómez-Aparicio et al., 2017; Gazol et al., 2018b; Hereş et al., 2018), modificando la dinámica del ecosistema y produciéndose la desertificación del mismo (Lavee et al., 1998).

En consecuencia, los ecosistemas semiáridos son uno de los grandes afectados por este fenómeno. Estos ecosistemas se caracterizan por poseer una alta resiliencia a las variaciones interanuales en el régimen de precipitación, sin embargo, en las últimas décadas se ha comprobado que sus especies forestales están siendo afectadas debido al incremento en la frecuencia e intensidad de las sequías (Huxman et al., 2004). Entre los ecosistemas semiáridos, la cuenca mediterránea se caracteriza por presentar una climatología con sequías estivales y periodos de lluvias concentrados en los meses de otoño e invierno. En este respecto, desde la segunda mitad del siglo XX, la parte Mediterránea de la Península ibérica ha experimentado cambios en el clima que favorecen una mayor aridez, produciéndose un incremento en las temperaturas

medias anuales, y un descenso en las precipitaciones medias anuales, lo que se ha reflejado en un aumento en la intensidad de los eventos climáticos extremos, con olas de calor cada vez más frecuentes y sequías estivales cada vez más intensas (Figura 1).

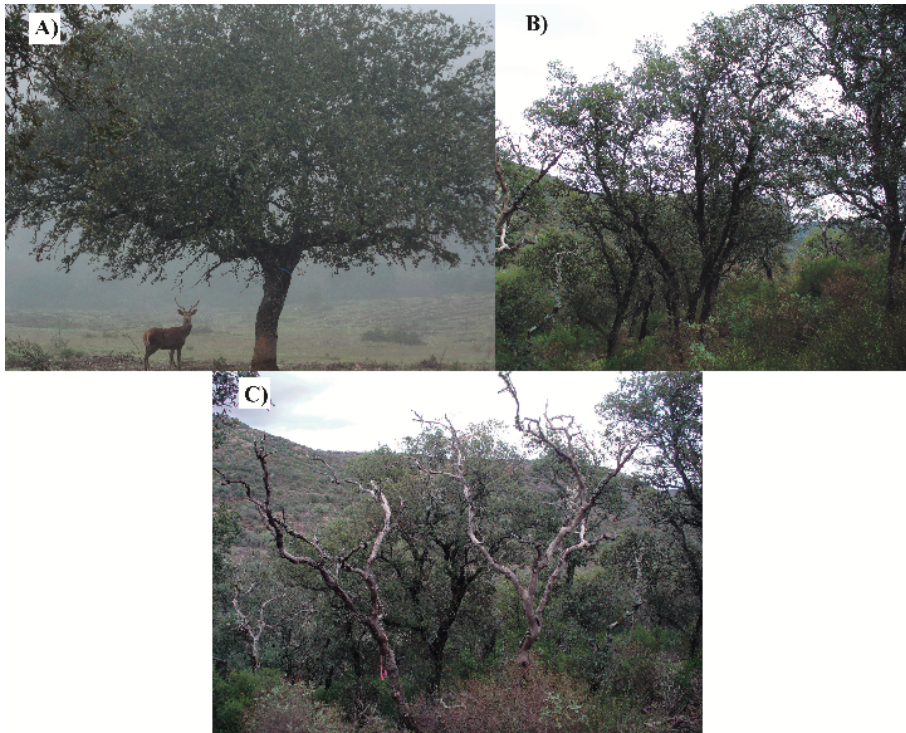


**Figura 1.** Representación de la variación en temperatura (MAT), precipitación (MAP) y sequías (SPEI) en la parte Norte (Navarra), Centro (Madrid) y Sur (Granada) de la Península ibérica durante los años 1950 - 2007. Las sequías se midieron con el índice de sequía SPEI (Standardised Precipitation - Evapotranspiration Index), valores positivos en este índice (azul) representa que no hubo sequía ese año; mientras que, valores negativos (rojo) representa la existencia sequía durante ese año. A) Temperatura media anual en Navarra; B) SPEI en Navarra; C) Precipitación anual media en Navarra; D) Temperatura media anual en Madrid; E) SPEI en Madrid; F) Precipitación anual media en Madrid; G) Temperatura media anual en Granada; H) SPEI en Granada; I) Precipitación anual media en Granada.



## INTRODUCCIÓN

Este cambio tan rápido e intenso en el clima (Figura 1) ha estado asociado con una pérdida en la salubridad (decaimiento) de una gran variedad de especies arbóreas a lo largo de la Península Ibérica (Barba et al., 2013; Avila et al., 2016; Barba et al., 2016b; Gómez-Aparicio et al., 2017; Rodríguez et al., 2017; Gazol et al., 2018b; Lloret and Kitzberger, 2018). Este decaimiento del arbolado se refleja en una disminución en el vigor general de las especies arbóreas, caracterizado por una pérdida o marchitamiento de hojas en la copa (defoliación), llegando a producir, en última instancia, la muerte del individuo (Figura 2). Este proceso de decaimiento forestal puede, además, tener enormes consecuencias a nivel funcional, ya que influye enormemente en las relaciones planta-suelo, así como en la estructura y funcionalidad de las comunidades microbianas del suelo (Lloret et al., 2015; Gazol et al., 2018a) y por consiguiente en los ciclos biogeoquímicos del suelo, como el ciclo del Carbono (C) y del Nitrógeno (N), modificando las reservas de C y N de los ecosistemas (Curiel Yuste et al., 2012; Rodríguez et al., 2017; Rodríguez et al., 2019; García-Angulo et al., submitted).

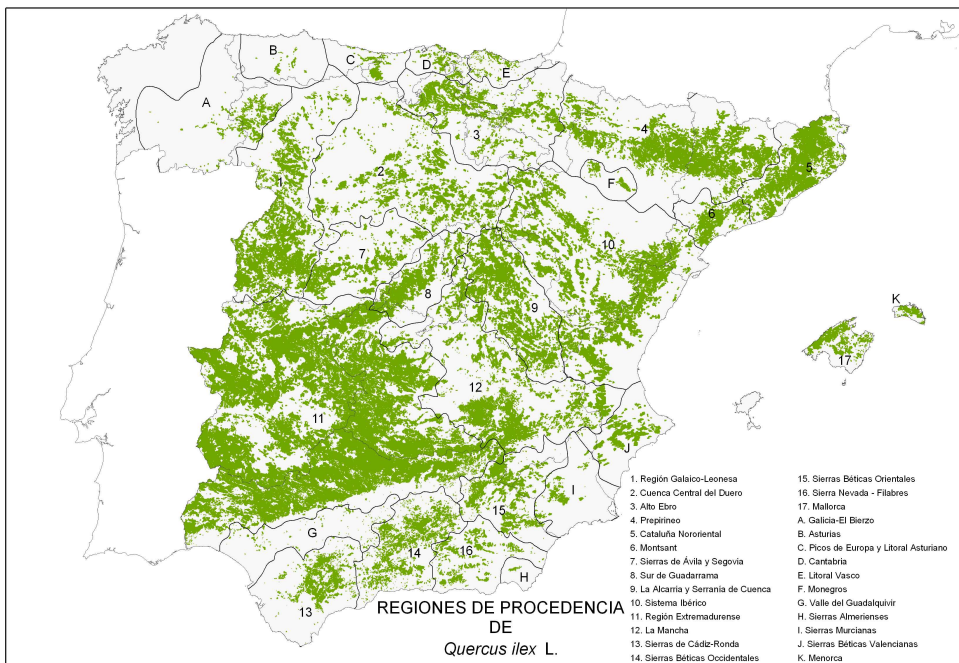


**Figura 2.** Estados de salud durante el decaimiento de la especie *Quercus ilex* subsp. *ballota* [Desf.] Samp. A) Encina sana; B) Encina mostrando síntomas de decaimiento en su copa; C) Encina muerta.

## El encinar mediterráneo en el contexto de cambio climático

### El encinar mediterráneo

La encina, *Quercus ilex* (*Holm oak* en inglés), presenta una amplia área de distribución a lo largo de la Península ibérica (Figura 3), presentando dos subespecies distintas según la climatología de la zona. Por una parte, *Quercus ilex* subsp. *ilex* se caracteriza por encontrarse en zonas costeras y húmedas de la Península ibérica (cornisa cantábrica y Cataluña, principalmente), mientras que, *Quercus ilex* subsp. *ballota* [Desf.] Samp. es capaz de aguantar climas más áridos, distribuyéndose ampliamente por el resto de la Península.



**Figura 3.** Área de distribución de *Quercus ilex* L. a lo largo de la Península ibérica (Alía et al., 2009).

A lo largo de esta tesis doctoral nos referiremos a *Quercus ilex* subsp. *ballota* [Desf.] Samp. cuando hablemos de la encina. En este sentido, la encina se caracteriza por ser un árbol perennifolio de menos de 25 metros de altura, con una copa densa y de gran amplitud, y un tronco recto que puede ramificarse cuando presenta más de 2 metros de altura. Esta especie presenta una gran tolerancia a condiciones climáticas extremas,

## INTRODUCCIÓN

pudiéndose encontrar en un gradiente altitudinal desde < 100 metros (Navarro Cerrillo et al., 2005) hasta los 2000 metros de altitud (Fernández-González et al., 2017). Además, su tolerancia a la temperatura y humedad es muy variable, pudiendo sobrevivir en ambientes con temperaturas que oscilan entre -3 a 11 °C en invierno y temperaturas medias estivales entre 14 y 28 °C. Por otro lado, su gradiente de humedad también puede abarcar un amplio rango, colonizando lugares con una precipitación media anual desde 300 mm hasta 2000 mm (Villar-Salvador et al., 2013).

En la Península ibérica la presencia de esta especie tiene un gran valor ambiental, ya que es un árbol capaz de tolerar las cada vez más extensas sequías estivales. Esto se debe a los mecanismos de resistencia que presenta la encina, proporcionándole una ventaja evolutiva frente a otras especies arbóreas, siendo capaz de sobrevivir las condiciones de aridez (Barbeta and Peñuelas, 2016). De este modo, la encina presenta un sistema radicular profundo (Ferrio et al., 2003), lo que le confiere la capacidad de penetrar en las fisuras que se producen en la roca madre y acceder a los pequeños depósitos de agua que se pudiesen encontrar en su interior (Barbeta et al., 2015). Por otro lado, la evolución de sus hojas también le confiere cierta ventaja evolutiva pudiendo resistir condiciones de baja humedad, gracias al desarrollo de pequeñas hojas esclerófilas capaces de cerrar los estomas cuando se produce una situación de deficiencia de agua (especie isohídrica), evitando, de este modo, la pérdida de agua por potenciales hídricos negativos (Barbeta and Peñuelas, 2016).

### **Manejo histórico de los encinares mediterráneo**

Las encinas se encuentran a lo largo de la Península ibérica formando diversos ecosistemas arbóreos, desde bosques naturales cerrados hasta ecosistemas abiertos, formados por la intervención del ser humano, denominados dehesas (Linares, 2007; Pulido et al., 2010; Guzmán Álvarez, 2016). En este sentido, los ecosistemas de bosques de encinas se caracterizan por ser entornos naturales, que han sido muy poco o nada manejados a lo largo de su historia, presentando un sustrato arbóreo elevado y de gran envergadura (MAGRAMA, 2007). Sin embargo, en las estructuras boscosas, el sustrato arbóreo puede presentar una alta competitividad por los recursos naturales, pudiendo provocar deficiencias a nivel hídrico, nutricional e incluso lumínico. Asimismo, estas deficiencias pueden verse promovidas por el incremento en las temperaturas y en las sequías provocadas por el cambio climático, produciendo una pérdida de salud en el sustrato arbóreo. Por ello, el ser humano ha utilizado una serie de técnicas de manejo

del suelo (*land-use* en inglés) para intentar paliar estos efectos, así como para aumentar la productividad de las formaciones boscosas (Canadell and Raupach, 2008). Una de las prácticas más comunes en el manejo del suelo es el fenómeno del “clareo” (*thinning*) que evita la alta competitividad de las masas forestales por los nutrientes y agua del suelo al reducir la densidad de arbolado mediante la extracción de ciertos individuos seleccionados con anterioridad (Saunders et al., 2012; del Río et al., 2017; Wu et al., 2019). El fenómeno del clareo produce una masa arbórea más abierta, lo que favorece el aporte de agua y nutrientes desde el suelo, facilitando, de este modo, la regeneración del arbolado y previniendo, en cierta medida, el efecto del cambio climático (Olivar et al., 2014; Navarro-Cerrillo et al., 2019).

En la Península ibérica, las prácticas de clareo y arado (manipulación mecánica del suelo para el incremento de la producción de cultivos) han sido altamente utilizadas desde la Edad Media para evitar la competición de los árboles por los nutrientes del suelo y favorecer el pastoreo del ganado (Guzmán Álvarez, 2016), reduciendo de este modo la cantidad de bosques naturales que se encuentran actualmente en la Península Ibérica. Como consecuencia, estas prácticas han generado sistemas de bosques abiertos con una alta densidad de especies herbáceas denominados “dehesas”, o “montados” en Portugal (Figura 4) (Díaz et al., 1997). Estos ecosistemas savanizados, pero artificialmente creados, son capaces de mantener una alta productividad en las regiones de clima mediterráneo donde, además de las limitaciones hídricas dadas por la sequía estival, los suelos son principalmente ácidos y pobres en nutrientes (Díaz et al., 1997; Moreno and Pulido, 2009). De este modo, a lo largo de la historia, el manejo al que han sido sometidas las dehesas se ha modificado ampliamente, presentando un gran cambio a finales de 1950 (Díaz et al., 1997). En estos años, España sufrió una transformación económica lo que llevó al abandono de un gran número de las dehesas y al remplazo de las áreas más fértiles en favor de tierras de cultivo (Campos Palacín and Naredo Pérez, 1980; Fernandez Ales et al., 1992). Este abandono ha favorecido la regeneración del arbolado de las zonas de dehesa, formando bosques abiertos de encinas o bosques mixtos junto a otras especies arbóreas que en muchos casos han sido utilizados con fines cinegéticos o como fuentes de extracción de madera (Ales et al., 1992).





**Figura 4.** Distribución característica de las dehesas (Plasencia), con las encinas separadas entre sí y una alta cantidad de cobertura herbácea (Imagen obtenida mediante la aplicación Google Earth).

### **Efecto del cambio climático en los encinares mediterráneos (La Seca)**

El incremento de las sequías debido al cambio climático, junto con la infección de ciertos patógenos, está generando que multitud de especies arbóreas sufran una pérdida de su vigor, llegando en algunos casos, a causar la muerte de los individuos (Adams et al., 2010; Allen et al., 2010; Carnicer et al., 2011). De este modo, en las últimas décadas, se ha observado que incluso especies tan adaptadas a cambios climáticos extremos, como la encina, están comenzando a sufrir también fenómenos de decaimiento (denominado “La Seca” en España) caracterizados por la pérdida de vigor del arbolado (ej. defoliación, marchitez de las hojas, mortandad de las raíces finas...) (Lloret et al., 2004; Saura-Mas et al., 2015).

En algunos casos, el decaimiento inducido por las sequías se ha visto a su vez estimulado por la aparición de especies patógenas. Varios estudios han demostrado que el oomycete *Phytophthora cinnamomi* es capaz de atacar las raíces finas de las especies del género *Quercus* produciendo lo que se conoce como podredumbre radical (Corcobado et al., 2013a; de Sampaio e Paiva Camilo-Alves et al., 2013; Corcobado et

al., 2014; Gallardo et al., 2019). La sintomatología que produce este oomycete es muy similar a la que se encuentra en el decaimiento causado por el cambio climático, ya que la muerte masiva de las raíces finas del árbol, reduce su capacidad para tomar agua y nutrientes del suelo (Caetano et al., 2010). Tanto el decaimiento inducido por cambio climático, como el decaimiento producido por patógenos, puede alterar las interacciones planta – suelo, modificando los ciclos biogeoquímicos del suelo y la diversidad y/o estructura de las comunidades microbianas del suelo (Curiel Yuste et al., 2012; Rodríguez et al., 2017; Rodríguez et al., 2019).

En este sentido, tanto los sistemas naturales de encinas (bosques), como los altamente manejados (dehesas), están mostrando síntomas de decaimiento. Sin embargo, algunos estudios han mostrado que los ecosistemas naturales presentan una mayor capacidad de resiliencia a este tipo de perturbaciones, siendo capaces de recuperarse (Nave et al., 2011; Barba et al., 2016a), gracias a la colonización de ciertos microorganismos a las raíces de los árboles sanos, así como de los árboles jóvenes (Curiel Yuste et al., 2019; Rodríguez-Calcerrada et al., 2019). No obstante, los ecosistemas de dehesa, donde las encinas están más separadas en el espacio y el sustrato vegetal esta altamente colonizado por herbáceas, el decaimiento produce un efecto más pronunciado, modificando la diversidad y la funcionalidad del ecosistema suelo (Rodríguez et al., 2017; Rodríguez et al., 2019).

### **El papel de la interacción planta – suelo en el contexto de cambio climático y decaimiento forestal**

Existen varias definiciones sobre qué es el suelo, la definición más tradicional dice que es el recurso natural sobre el que se erigen las especies vegetales terrestres, captando agua, oxígeno y nutrientes a través del sistema radicular. Una definición más compleja lo definiría como “el producto final de la influencia del tiempo combinado con el clima, topografía, organismos (flora, fauna y ser humano) y materiales parentales (rocas y minerales originarios)” (FAO, 2017). En este contexto, la vegetación vascular, concretamente las especies forestales han jugado un papel determinante, aportando una fuente de materia orgánica y favoreciendo la erosión de las rocas y los minerales (*weathering*) (Lambers et al., 2009; Blume et al., 2016).

El espacio del suelo bajo la influencia de la planta, donde los microorganismos dependen directamente del aporte de su sustrato y llevan a cabo su descomposición, interaccionando a su vez con la planta, se denomina rizosfera. La rizosfera fue descrita

## INTRODUCCIÓN

por primera vez por el agrónomo alemán Lorenz Hiltner en el año 1904 (Hartmann et al., 2008). Hiltner describió la rizosfera como el área alrededor de la raíz de una planta habitada por una población de microorganismos, que están a su vez, influenciados por los compuestos químicos que liberan las raíces de la planta. En la rizosfera se desarrollan, además, relaciones simbióticas entre la planta y la microbiota que facilitan, por una parte, la adquisición de nutrientes por parte de la planta y por otra, la adquisición de sustrato para el crecimiento y mantenimiento del metabolismo de la microbiota. Por ejemplo, en suelos calcáreos, las concentraciones de fósforo (P) en suelo suelen ser muy reducidas, pudiendo ser un factor limitante para el crecimiento de las especies vegetales. Para remediar estas limitaciones, las plantas pueden asociarse a distintos hongos formando una relación de simbiosis denominada micorriza, la cual puede darse en todo tipo de suelos, indiferentemente del pH al que se encuentre (Bolan, 1991; Richardson et al., 2009). Estas relaciones simbióticas son muy frecuentes en la naturaleza pudiéndose encontrar en una alta cantidad de especies arbóreas, siendo la más común la formada por las denominadas ectomicorrizas (ECM) (Diagne et al., 2013). Las ECM son un tipo de micorriza capaz de proporcionar P y N a las especies arbóreas con las que interaccionan. Sin embargo, las ECM no son las únicas relaciones simbióticas que una planta puede tener; en algunos casos, es necesaria la asociación con otro tipo de micorrizas, como por ejemplo las micorrizas arbusculares y/o micorrizas ericoides que facilitan la adquisición de compuestos tanto fosfatados como nitrogenados en diferentes cantidades (Kerley and Read, 1998; Brundrett, 2009). Este tipo de interacciones son beneficiosas tanto para la planta como para el hongo; ya que, mientras que la planta es capaz de acceder a nutrientes que de otra forma serían de difícil absorción, los hongos obtienen una fuente de C a través de las raíces de la planta (Paterson, 2003; Lambers et al., 2009). Estas amplias asociaciones con hongos han hecho que algunos autores hablen de la mico-rizosfera (Barea et al., 2013; Azcón-Aguilar and Barea, 2015). Por otra parte, las asociaciones simbióticas no sólo se dan entre especies vegetales y hongos; las bacterias también son capaces de formar una asociación con algunas plantas, generalmente leguminosas, formando nódulos que les ayudan a fijar el nitrógeno atmosférico molecular ( $N_2$ ) en forma de amonio ( $NH_4^+$  - N) asimilable por la planta (Vessey et al., 2005; Franche et al., 2009).

Además de estas asociaciones simbióticas planta-microorganismo, las plantas son capaces de excretar, mediante un proceso llamado rizodeposición, una serie de compuestos orgánicos, exudados, que interaccionan con los microorganismos, aportándoles una fuente de C lábil a cambio de obtener los nutrientes necesarios para

su crecimiento. La rizodeposición tiene un gran efecto en la rizosfera, generando una microbiota diferente a la que se puede encontrar en el suelo no rizosférico (Hartmann et al., 2008). Este cambio en la microbiota de la rizosfera puede deberse a la producción de antibióticos y/o fungicidas por parte de los microorganismos, lo que ayudará a controlar la colonización de especies patógenas de la planta (Dobbelaere et al., 2003). Además, la liberación de C al suelo mediante rizodeposición puede estimular la mineralización de la materia orgánica del suelo generando lo que se conoce como “priming effect” promoviendo el ciclado de nutrientes del suelo (Kuzyakov, 2002; Blagodatskaya and Kuzyakov, 2008).

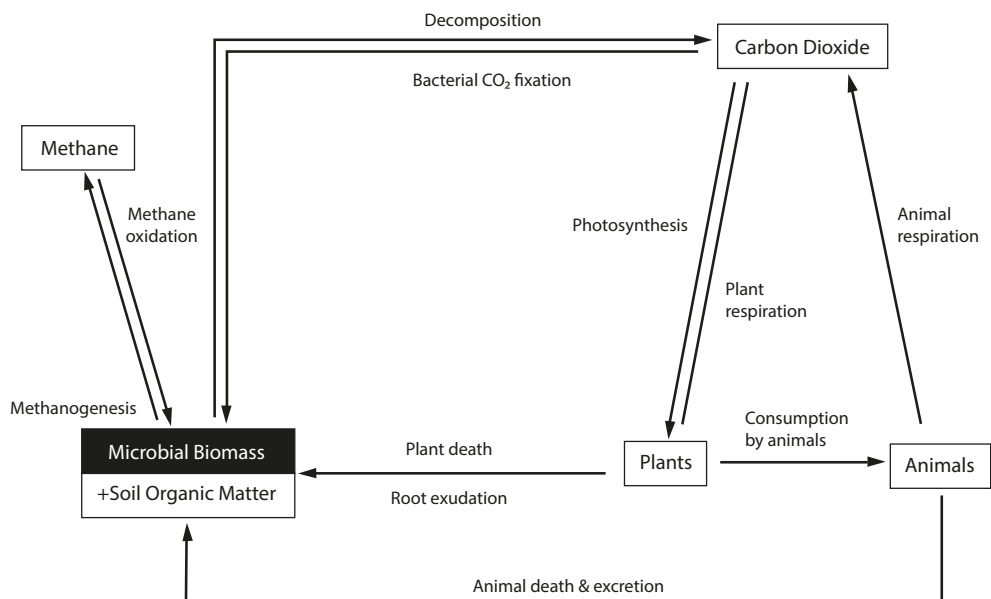
## **El papel de las interacciones planta-suelo en los ciclos biogeoquímicos**

### **Ciclo del Carbono**

El suelo es uno de los grandes depósitos de C a nivel global, ya que se ha estimado que almacena más de 2500 gigatoneladas de C (Lal, 2004). Esta reserva de carbono es, además, una reserva a largo plazo ya que el carbono puede permanecer en el suelo por milenios (Clemmensen et al., 2013). El recambio de C en los suelos terrestres depende del balance entre los procesos de producción primaria bruta del sistema, fruto de la fotosíntesis y la respiración del sistema, tanto de la parte autotrófica, dominada por la respiración de raíces y microorganismos rizosféricos, como de la de los procesos de respiración aeróbica de la biota que habita el suelo, que se conoce como respiración heterotrófica. El resultado de la respiración aeróbica heterótrofa viene dado por catabolismo de la materia orgánica del suelo produciendo el proceso de descomposición de la materia orgánica del suelo (MOS). Esta descomposición de la MOS viene dada exclusivamente por procesos de respiración microbiana (Trumbore, 2006; Gougoulas et al., 2014). De este modo, el C capturado por las plantas mediante la fotosíntesis actúa como la principal fuente de C orgánico en el suelo (COS), que es depositado a través de su biomasa vegetal (ej. hojas, partes de ramas, tronco...), o de las secreciones que producen las raíces de la planta (ej. rizodeposición) (Paterson, 2003). Además, el COS puede provenir de otras fuentes externas como la deposición de excrementos animales o de la necromasa generada por los microorganismos del suelo (ej. bacterias, hongos, nematodos...) (Figura 5) (Liang and Balser, 2010).



## INTRODUCCIÓN



**Figura 5.** Representación del ciclo del carbono en el suelo. Imagen modificada de Gougoulas et al. (2014)

La magnitud en la mineralización de la MOS por parte de la biota del suelo varía según su composición y su interacción con los diferentes compartimentos, bióticos y abióticos, que conforman el sistema suelo. Por ejemplo, la estabilización de la MOS, que lleva a una baja mineralización de MOS, puede llevarse a cabo debido a una inaccesibilidad espacial (separación física) de los compuestos orgánicos (ej. C) y los microorganismos del suelo (von Lützow et al., 2008). Por otra parte, el COS puede diferenciarse en dos tipos distintos de C según la facilidad que presenten los microorganismos en su descomposición (C recalcitrante o C lábil) (Horwath, 2015; Zhang and Zhou, 2018). El COS recalcitrante se caracteriza por estar compuesto de partículas de difícil descomposición y suele estar formado por compuestos de la pared celular de la biomasa vegetal (ej. lignina, celulosa o hemicelulosa) (Ruiz-Dueñas and Martínez, 2009). La lignina es el segundo mayor constituyente de la biomasa vegetal y una fuente de C recalcitrante. Su compleja estructura dificulta el ataque de las enzimas microbianas, siendo principalmente los hongos de los filos Ascomycota y Basidiomycota los encargados de su degradación gracias a la secreción de enzimas lignolíticas (Leonowicz et al., 1999; Martínez et al., 2005). Por otro lado, aunque las bacterias no pueden degradar C recalcitrante de forma tan eficiente como los hongos, algunas bacterias Gram-negativas, pertenecientes a los filos Proteobacterias

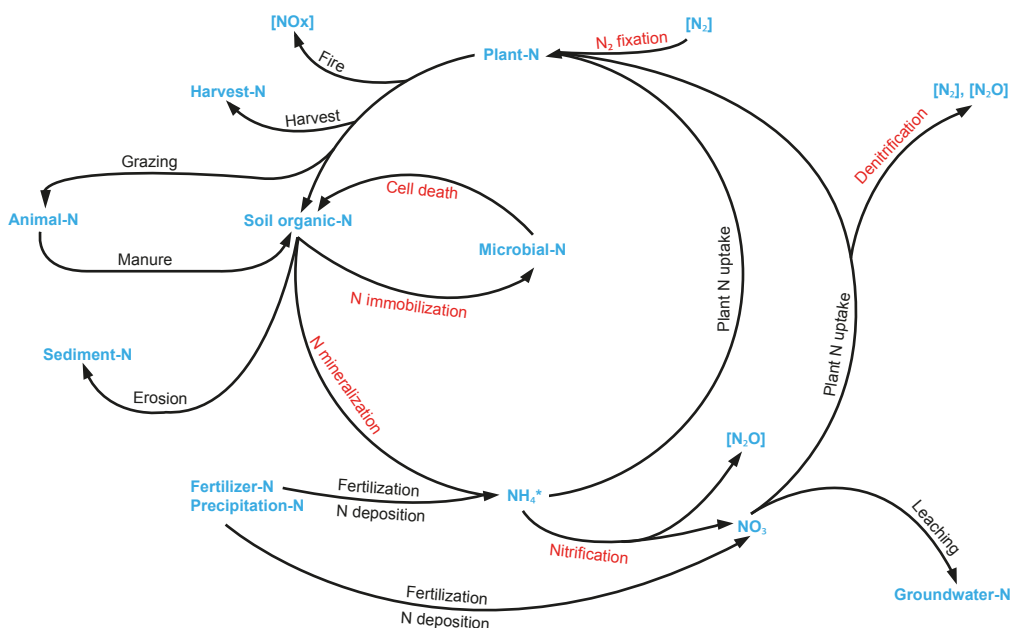
(Bandounas et al., 2011; Tian et al., 2014) y Actinobacterias (Abdel-Hamid et al., 2013), son capaces de atacar parte de la estructura de la lignina, facilitando el acceso a carbohidratos más simples (Horwath, 2015).

Por otro lado, el COS lábil está compuesto por hidrocarburos de rápida descomposición, como los restos de microorganismos (necromasa microbiana), materia orgánica disuelta y exudados de las raíces de las plantas (Zhang and Zhou, 2018). Su descomposición se lleva a cabo gracias a un proceso aeróbico denominado respiración microbiana del suelo. Este proceso es el procedimiento más común de mineralización del COS, liberando el C a la atmósfera en forma de CO<sub>2</sub>. La respiración heterotrófica del suelo es llevada a cabo por una gran variedad de microorganismos del suelo, siendo el proceso mediante el cual absorben el C necesario para la formación de sus estructuras celulares (Gougoulas et al., 2014). Por otro lado, si el suelo se encuentra en zonas con bajas concentraciones de oxígeno (ej. humedales), los microorganismos (arqueas principalmente) cambiarán de aceptor de electrones utilizando el carbono en vez del oxígeno; y realizando de este modo, lo que se conoce como metanogénesis, liberando metano hacia la atmósfera (Le Mer and Roger, 2001).

## INTRODUCCIÓN

### Ciclo del Nitrógeno

El nitrógeno se caracteriza por ser un elemento que puede encontrarse en multitud de formas diferentes en el suelo, gracias a las diversas transformaciones que sufre debido a la interacción con los microorganismos (Figura 6) (Robertson and Groffman, 2015).



**Figura 6.** Representación del ciclo del nitrógeno en el suelo. Los procesos mediados por microorganismos del suelo aparecen resaltados en rojo. Imagen modificada de Robertson and Groffman (2015).

El N puede entrar en el ecosistema suelo a través de diversas vías. Por un lado, la fijación del  $N_2$  atmosférico, por parte de las bacterias fijadoras de nitrógeno, aporta una parte del N que la planta necesita (Vessey et al., 2005; Franche et al., 2009). Sin embargo, la mayor fuente de N hacia el suelo viene dada por la deposición de materia orgánica de las plantas y los excrementos de animales. El N orgánico que se encuentra en la MOS sufre una serie de transformaciones por parte de los microorganismos del suelo. El primer paso es el fenómeno que se conoce como amonificación, que se da de manera simultánea junto con la inmovilización del N. Los microorganismos del suelo son capaces de mineralizar la MOS, inmovilizando los compuestos como parte de sus estructuras nitrogenadas o liberándolo en forma de amonio ( $NH_4^+ - N$ ) (Bengtsson et

al., 2003; Chen et al., 2011; Zhang et al., 2011; Prosser and Nicol, 2012). La liberación de amonio, debida al proceso de amonificación – inmovilización, varía según la calidad de la MOS y el ratio C:N. Como regla general, se suele entender que ratios C:N > 25:1 estimulan la inmovilización del N, mientras que ratios < 25:1 estimulan la amonificación y por tanto la liberación de amonio al suelo que será absorbido por las plantas o transformado de nuevo por el proceso de nitrificación (Bengtsson et al., 2003; Robertson and Groffman, 2015).

La nitrificación es la oxidación del amonio por parte de los microorganismos a formas menos reducidas. Este proceso ocurre en dos pasos, el primero lo llevan a cabo las bacterias y arqueas amonio-oxidantes (Zhang et al., 2011), que producirán los nitritos que serán oxidados a su vez por las bacterias nitrito-oxidantes teniendo como resultado final el anión nitrato ( $\text{NO}_3^-$  - N). Las bacterias amonio-oxidantes son principalmente géneros de la clase  $\beta$ -Proteobacteria (géneros *Nitrosomonas* y *Nitrospiras*) (Prosser and Nicol, 2012); mientras que, las bacterias nitrito-oxidantes se caracterizan por ser bacterias del género *Nitrobacter* (clase  $\alpha$ -Proteobacteria), *Nitrospira* ( $\delta$ -Proteobacteria) o *Nitrosococcus* ( $\gamma$ -Proteobacteria) (Juretschko et al., 1998; Koch et al., 2015; Daims et al., 2016).

Estas formas nitrogenadas pueden seguir varias vías en sus diferentes transformaciones. Las plantas son capaces de absorber parte de este amonio y nitrato del suelo, aunque tienen preferencia por adquisición de amonio (Robertson and Groffman, 2015). Por otro lado, el nitrato puede sufrir el fenómeno de reducción conocido como desnitrificación, que es un proceso anaeróbico mediante el cual los microorganismos reducen el  $\text{NO}_3^-$  - N hasta  $\text{N}_2$  para ser liberado de nuevo a la atmósfera (Morse et al., 2015). Por último, el nitrato, al ser un compuesto muy móvil, puede ser eliminado del ecosistema a través de la lixiviación, lo que puede causar fenómenos de contaminación ambiental (ej. eutrofización) si se produce en altas concentraciones (Stark and Richards, 2008).

### **Efecto del manejo histórico de las encinas en el ecosistema suelo**

Las diferentes prácticas de gestión de los bosques, que sirven principalmente para mejorar el rendimiento de las parcelas, tienen un marcado efecto en el ecosistema suelo debido, en gran medida, al cambio en el aporte nutricional del sustrato arbóreo. En este sentido, varios estudios han demostrado que la transformación de un bosque natural en un sistema de tierras de cultivo resulta en cambios muy marcados en la

## INTRODUCCIÓN

abundancia y diversidad de las comunidades microbianas del suelo (de Carvalho et al., 2016; Flores-Rentería et al., 2016; Petersen et al., 2019), afectando en última instancia a los ciclos biogeoquímicos del C y del N (Murty et al., 2002; Wei et al., 2014; Flores-Rentería et al., 2018). Del mismo modo, las prácticas de clareo y arado ha mostrado que pueden alterar la capacidad de las comunidades microbianas del suelo de realizar correctamente las diversas funciones que llevan a cabo (ej. mineralización del carbono, nitrificación del N orgánico...), así como de alterar la dinámica nutricional entre el suelo y la planta, debido a la extracción del sustrato arbóreo o a la manipulación directa del suelo (Anderson et al., 2017; Wu et al., 2019).

En la Península ibérica, donde los encinares han sufrido un enorme manejo antropogénico, los ciclos biogeoquímicos y las comunidades microbianas del suelo se han visto enormemente afectados. Por ejemplo, en las dehesas, el aporte de C hacia el suelo se ve mermado debido a los fenómenos de clareo, los cuales disminuyen una de las principales fuentes de C hacia el sistema suelo al eliminar la deposición de las hojas o el sistema radicular de los árboles extraídos (Kuzyakov, 2002; Tang and Baldocchi, 2005; Blagodatskaya and Kuzyakov, 2008). Esta disminución de la materia orgánica del suelo, puede afectar a los microorganismos copiotrofos, como las proteobacterias (Pascault et al., 2013; Goberna et al., 2016; Yan et al., 2018), en favor de bacterias u hongos saprófitos capaces de descomponer el C recalcitrante (Martinez-Garcia et al., 2012; Voříšková and Baldrian, 2013; Spring et al., 2016). Por otro lado, los compuestos nitrogenados se ven, en algunos casos, favorecidas ya que, al eliminar el sustrato arbóreo y subsecuentemente su absorción de N, se facilita la colonización de especies fijadoras de nitrógeno pertenecientes al sustrato herbáceo (Elliott et al., 2015; Thilakarathna et al., 2016). Asimismo, estos ecosistemas de dehesa se caracterizan por la presencia de ganado, lo que promueve el incremento en el N orgánico del suelo debido a la deposición de excrementos (Oenema et al., 2005; de Bastos et al., 2019). Estos cambios en los ciclos biogeoquímicos están altamente relacionados con las comunidades microbianas del suelo, alterando su funcionalidad (ej. mineralización del C y del N) y en muchos casos su abundancia o estructura (ej. reducción de microorganismos copiotrofos, incremento de bacterias nitrificantes, etc.) (de Carvalho et al., 2016; Petersen et al., 2019).

## **Efecto del cambio climático y el decaimiento forestal en los ciclos biogeoquímicos y las comunidades microbianas del suelo**

El clima ejerce un enorme control sobre los ciclos biogeoquímicos, así como sobre el metabolismo de las comunidades microbianas del suelo responsables en gran medida del ciclado de carbono y nutrientes en el sistema suelo. Varios estudios han demostrado la influencia directa que tiene la temperatura y la disposición de agua en el ciclo del carbono (Curiel Yuste et al., 2007; Sanaullah et al., 2014; Curiel Yuste et al., 2017; Jeong et al., 2018) y del nitrógeno (Koch et al., 2007; Lupon et al., 2015; Xu et al., 2016; Rodríguez et al., 2019).

Sin embargo, el efecto indirecto del cambio climático (ej. sequías, decaimiento forestal) en el ciclado de nutrientes es mucho mayor. Por ejemplo, el efecto que tiene el decaimiento de los árboles en el ecosistema suelo afecta enormemente al ciclado de nutrientes, siguiendo una tendencia no lineal. La pérdida de vigor de los árboles produce un incremento en la biomasa vegetal del suelo debido a la deposición de las hojas y de las raíces finas de la planta, lo que aumentará la MOS, y por tanto las fuentes de carbono y nitrógeno orgánico del suelo (Kaňa et al., 2013; Grüning et al., 2017; Curiel Yuste et al., 2019). Este incremento de la materia orgánica del suelo puede producir un cambio en las comunidades microbianas del suelo, favoreciendo el crecimiento de hongos de los filos Ascomycota y Basidiomycota (Leonowicz et al., 1999; Martínez et al., 2005) capaces de degradar la lignina de las hojas en compuestos de fácil asimilación (COS), los cuales serán degradados posteriormente por las Proteobacterias y Actinobacterias del suelo incrementando las emisiones de CO<sub>2</sub> a la atmósfera desde el suelo (Fierer et al., 2013; Banerjee et al., 2016b; Goberna et al., 2016). Este incremento del COS debido a la deposición de biomasa vegetal junto con las secreciones de C por parte de las raíces (rizodeposición) puede producir el fenómeno de *priming*, el cual estimula la descomposición de la materia orgánica por parte de estos microorganismos gracias al aporte de un sustrato de fácil descomposición (Kuzyakov, 2002; Blagodatskaya and Kuzyakov, 2008). El incremento en la descomposición de las fuentes de C, junto con la pérdida de vigor y/o muerte de los árboles puede provocar que las masas arbóreas pierdan su capacidad como sumideros de carbono, volviéndose, por tanto, fuentes de C hacia la atmósfera (Adams et al., 2010; Hicke et al., 2012).

## INTRODUCCIÓN

Por otro lado, si las sequías persisten, provocando la muerte de las especies arbóreas, y por tanto eliminando la rizodeposición (*priming*) y la absorción de nutrientes esenciales por la planta como el N y P en el suelo (Griffin et al., 2011; Rodríguez et al., 2017; García-Angulo et al., submitted), pueden provocar la pérdida de estos nutrientes a través de la lixiviación durante episodios de lluvia intensa (Barakat et al., 2016). Asimismo, la muerte del árbol cambia las condiciones abióticas (temperatura y humedad del suelo) y disminuye el aporte de C lábil en forma de rizodeposición, lo que puede provocar un cambio en las comunidades microbianas del suelo en favor de especies más resistentes a la sequía y las fluctuaciones de temperatura así como a especies más relacionadas con la descomposición de C recalcitrante, como especies del filo Verrucomicrobia (Spring et al., 2016; Trivedi et al., 2017) u hongos saprófitos (Ma et al., 2013; Voříšková and Baldrian, 2013), sobre microorganismos más copiotrofos como las Proteobacterias (Pascault et al., 2013; Goberna et al., 2016; Yan et al., 2018). Este cambio en las fuentes de C lábil/recalcitrante por parte de los árboles, va a disminuir la respiración heterotrófica del suelo, decreciendo de este modo las emisiones de CO<sub>2</sub> desde el suelo (Avila et al., 2016).

## **OBJETIVOS**



El objetivo principal de esta tesis doctoral es evaluar el efecto que tiene el decaimiento de los encinares mediterráneos, así como el efecto de su manejo histórico, en los ciclos biogeoquímicos del suelo y las comunidades microbianas del suelo (bacterias y hongos). Para ello, se ha realizado un estudio a escala regional abarcando tres tipos diferentes de manejo histórico (bosques, bosques abiertos y dehesas) en los que la encina (*Quercus ilex*) presentaba signos de decaimiento a lo largo de la Península Ibérica. Para llevar esto a cabo, esta tesis doctoral se ha dividido en tres capítulos diferentes en los que se establecieron los siguientes objetivos específicos:

### **Capítulo 1**

1. Analizar el efecto de las variables climáticas (temperatura y precipitación) y el pH del suelo sobre la funcionalidad de las comunidades microbianas del suelo.
2. Evaluar el efecto del decaimiento producido por la sequía sobre los ciclos biogeoquímicos del suelo en los diferentes manejos históricos presentados por la encina.

### **Capítulo 2**

1. Analizar los cambios que produce el manejo histórico del encinar en la estructura y diversidad del núcleo de las comunidades microbianas del suelo mediante el estudio de redes de coocurrencia.
2. Examinar la sensibilidad a las variables abióticas (clima y pH) y nutricionales del núcleo de las comunidades microbianas del suelo en los diferentes manejos históricos de la encina.

### **Capítulo 3**

1. Evaluar los efectos del decaimiento del encinar en la alfa y beta diversidad de las comunidades microbianas del suelo.
2. Analizar la interacción entre el decaimiento y el manejo histórico del encinar en la microbiota del suelo.

# **MATERIAL Y MÉTODOS**

## Área de estudio

Las áreas de estudio se ubican en 13 localizaciones situadas a lo largo de la Península Ibérica, cubriendo una amplia área de distribución de nuestra especie de estudio, la encina (*Quercus ilex* subsp. *ballota* [Desf.]), a lo largo de España (Figura 7). Uno de los parámetros clave para elegir nuestras áreas de estudio fue la presencia de decaimiento en cada una de estas zonas (ej. defoliación, marchitamiento de las hojas...). Para encontrar localizaciones con estas características, se llevó a cabo un estudio previo en el que se recurrió a inventarios y bases de datos de diferentes entidades:

- *Entidades europeas*: International Co-operative Programme on Assessment and Monitoring of Air Pollution Effects on Forests (ICP Forest) (<http://icp-forests.net/>)
- *Entidades españolas*: tercer Inventario Forestal Nacional (IFN3) (MAGRAMA, 2007)
- *Estudios previos*: estudios científicos realizados por Lloret et al. (2004), Corcobado et al. (2013a) Camarero et al. (2014); Camarero et al. (2015).

Tras una amplia búsqueda, se seleccionaron las áreas de muestreo, abarcando un gradiente tanto climático (Norte y Sur de la Península Ibérica) como de pH [Este y Oeste de la Península Ibérica, debido a la cobertura de la Península Ibérica por el mar Tethys en el Cretácico (Rat, 1982)] (Tabla 1).

## Manejo histórico de las zonas de muestreo

Otra de las características al seleccionar nuestras zonas de muestreo fue el diferente manejo histórico al que estaban sometidos. *Q. ilex* se puede encontrar en un amplio rango de usos del suelo en la Península Ibérica, por lo que nosotros seleccionamos zonas de muestreo que presentan tres manejos diferentes de acuerdo con la intensidad de manejo a la que están expuestos:

- *Bosques (forest - FR)*: zonas poco o nada manejadas en las que se puede encontrar la encina en su estado natural. Se caracterizan por presentar árboles cubriendo la mayor parte del ecosistema. Puede estar compuestos por varias especies diferentes de arbolado, siendo la encina siempre la especie predominante. El sustrato arbustivo puede variar según la zona de muestreo.

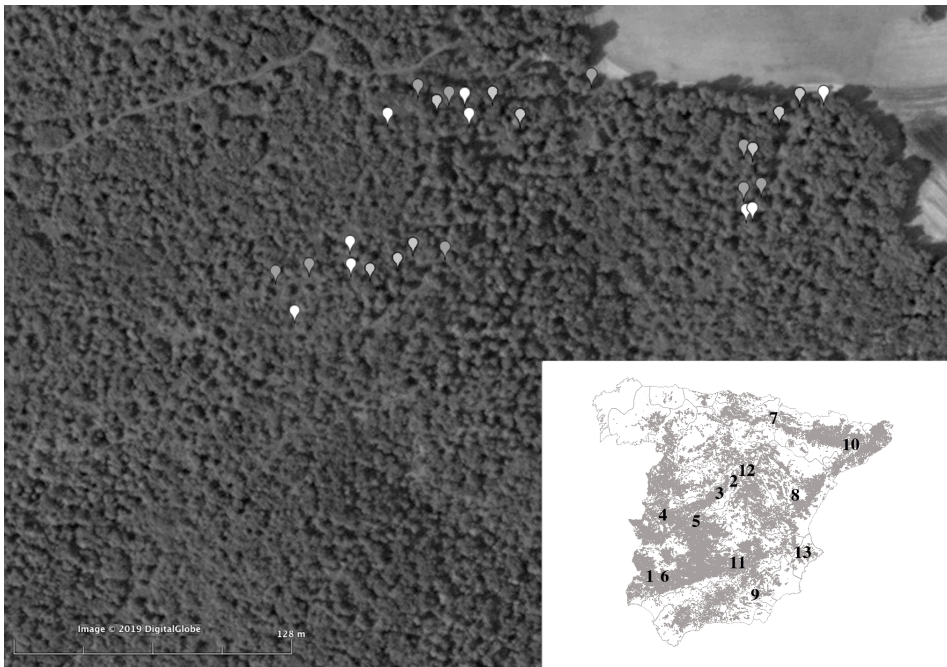
## MATERIAL Y MÉTODOS

- *Dehesas (DH)*: sistema agrosilvopastoral comúnmente encontrado en España. Son zonas en las que la intensidad de manejo es muy alta debido a su carga ganadera (ej. ganado porcino o bovino). Se caracteriza por presentar árboles de gran tamaño del género *Quercus*, muy separados entre ellos, y con una alta carga de sustrato herbáceo.
- *Bosques abiertos (open woodland – OW)*: zonas con un manejo medio. Estas localizaciones presentaron una alta intensidad de manejo en las décadas anteriores, siendo abandonadas en la actualidad o cambiando a un uso cinegético. Se caracterizan por una cantidad de arbolado intermedio, con alta cantidad de claros y un sustrato arbustivo y herbáceo variable.

Para diferenciar entre los diferentes usos del suelo que se plantean en este estudio, se llevó a cabo un análisis ortofotográfico de las diferentes áreas de muestreo. Para la adquisición de las imágenes se utilizó el visor SignA (Sistema de Información Geográfica Nacional) del Ministerio de Fomento español (<http://signa.ign.es/signa/Pege.aspx>) utilizando la capa “Imágenes de satélite Spot y ortofotos PNOA”. Una vez localizada la zona de muestreo en el mapa, se trazó un cuadrado de 1 hectárea (ha) de superficie desde el que se calculó la cobertura arbórea de cada zona de muestreo. Para este cálculo, se utilizó el programa Adobe Photoshop CS5, analizando el número de píxeles ocupado por el sustrato arbóreo y calculando su porcentaje a partir de los píxeles totales.

Una vez calculada la superficie arbórea de cada zona de muestreo, se clasificaron según los criterios encontrados en el IFN3 (MAGRAMA, 2007), modificados para abarcar el nuevo manejo (OW):

- *Bosques*: caracterizados por tener una cobertura arbórea mayor al 60% de la cobertura total por hectárea.
- *Dehesas*: caracterizados por tener una cobertura arbórea menor al 30% de la cobertura total por hectárea.
- *Bosques abiertos*: caracterizados por tener una cobertura arbórea comprendida entre el 30% y el 60% de la cobertura total por hectárea.



**Figura 7.** Mapa de las localizaciones de muestreo junto con el área de distribución de la encina a lo largo de España. La figura muestra el diseño experimental del estudio con las 3 parcelas seleccionadas para una localización (como ejemplo), donde se seleccionaron 9 encinas sanos (blanco), afectados (gris) y muertos (gris oscuro). La numeración corresponde con la mostrada en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Tabla detallada de las localizaciones de muestreo incluyendo el manejo histórico (DH: dehesa; OW: bosques abiertos; FR: bosques). % Cc ha<sup>-1</sup> = Porcentaje de defoliación por hectárea; MAT = Temperatura anual media; MAP = Precipitación anual.

Localización (Comunidad autónoma)	Manejo	Latitud	Longitud	Altitud (m)	% Cc ha <sup>-1</sup>	MAT (°C)	MAP (mm)	pH suelo
Huelva (Andalucía) <sup>1</sup>	DH	37.9820	-6.5125	405	16	16.15	892	5.89
Tres Cantos (Madrid) <sup>2</sup>	DH	40.6714	-3.6827	806	15	12.86	591	5.54
Chapinería (Madrid) <sup>3</sup>	DH	40.3833	-4.1938	649	27	12.88	601	6.35
Plasencia (Extremadura) <sup>4</sup>	DH	39.8775	-6.0490	367	10	15.37	740	5.38
Talavera de la Reina (Castilla-La Mancha) <sup>5</sup>	OW	39.7846	-5.0742	427	47	15.41	559	5.87
Sevilla (Andalucía) <sup>6</sup>	OW	37.9727	-6.0193	729	45	15.15	637	6.04
Pamplona (Navarra) <sup>7</sup>	OW	42.7323	-1.7504	624	48	10.62	919	7.33
Formiche Bajo (Aragón) <sup>8</sup>	OW	40.2974	-0.8727	1044	43	13.08	497	7.78
Granada (Andalucía) <sup>9</sup>	OW	37.5012	-2.5042	1221	42	12.41	326	7.03
Lleida (Cataluña) <sup>10</sup>	FR	41.8304	1.4516	609	63	13.08	569	7.19
Ciudad Real (Castilla-La Mancha) <sup>11</sup>	FR	38.5056	-3.2480	814	85	14.52	484	6.29
Guadalajara (Castilla-La Mancha) <sup>12</sup>	FR	40.8753	-3.1626	889	84	12.10	573	4.86
Alcoy (Alicante) <sup>13</sup>	FR	38.6659	-0.5395	1014	90	13.83	519	7.52

### Diseño experimental

En cada punto de muestreo, se eligieron 3 subzonas diferentes para captar la gran heterogeneidad encontrada en este tipo de ecosistemas. Para elegir los árboles a muestrear, se escogió un punto medio en cada sub-zona siguiendo la metodología descrita por Medina et al. (2015). Una vez seleccionado el punto medio, se eligieron encinas que presentaban tres estados de salubridad diferentes, estimando de manera visual el porcentaje de defoliación que presentaba la copa de las encinas y diferenciando 3 tipos diferentes de salud (Rodríguez et al., 2017; Hereş et al., 2018).

- *Encina sana*: encina con una defoliación menor a un 25% de su copa.
- *Encina afectada*: encina con una defoliación alta, entre un 25% y un 99% de la copa defoliada.
- *Encina muerta*: encinas que presentan una defoliación del 100%.

Una vez estimado el estado de salud de las encinas, se seleccionaron, en cada subzona, nueve árboles diferentes, escogiendo tres encinas para cada tipo de salud. De esta forma, se seleccionaron 351 encinas a lo largo de los 13 puntos de muestreo (13 puntos de muestreo x 3 subzonas x 3 estados de salud x 3 árboles).

### Descripción de las zonas de muestreo

Para caracterizar las zonas de muestreo utilizamos la ficha presentada en la figura 8. En esta ficha se recogieron los datos pertenecientes a cada árbol muestreado, así como su grado de defoliación. Además, se calculó la altura, diámetro a la altura del pecho (DBH) y dosel del árbol; utilizando un clinómetro, una cinta de DBH y la fórmula de la elipse, respectivamente.

En esta ficha también se recogieron datos referentes a la cobertura vegetal encontrada en un radio de 5 metros de la encina, diferenciando entre cobertura arbustiva, cobertura herbácea, pedregosidad y zonas sin cobertura vegetal. Por último, se recogieron datos del número de árboles con un DBH menor a 15 cm (denominados árboles jóvenes) y de los árboles con DBH mayor a 15 cm (denominados árboles adultos). Estas estimaciones se realizaron de manera visual mediante el consenso de cuatro observadores diferentes para mantener la consistencia de los datos.



Punto muestreo:					Fecha:	Cobertura (a 5 metros)			
SubZona / Chapa	Salud	Grado defol	Altura (m, %/%)	Dosel	DBH	Árbol >15 cm	Árbol <15 cm	Arbustos	Herbáceas
	Sano		D= /	L= A=					
	Sano		D= /	L= A=					
	Sano		D= /	L= A=					
	Defoliado		D= /	L= A=					
	Defoliado		D= /	L= A=					
	Defoliado		D= /	L= A=					
	Muerto	100 %	D= /	L= A=					
	Muerto	100 %	D= /	L= A=					
	Muerto	100 %	D= /	L= A=					

Figura 8. Tabla para el muestreo de campo en cada subzona de muestreo.

Con los datos extraídos de esta tabla, así como de las ortoimágenes y la base de datos de suelos de la FAO (Fischer et al., 2008), se pudieron caracterizar los diferentes puntos de muestreo.

- *Huelva (Andalucía)*: dehesa caracterizada por una alta carga ganadera. En el momento del muestreo se encontró una gran cantidad de jara pringosa (*Cistus ladanifer*), además de otras especies del género *Quercus* (ej. Alcornoques, *Q. suber*). Los árboles en esta parcela se caracterizan por tener un gran dosel y altura. El suelo de esta zona se corresponde a un Cambisol tipo Eútrico.
- *Tres Cantos (Madrid)*: dehesa con carga ovina, caracterizada por estar compuesto de árboles de encina y enebro (*Juniperus communis*), así como un alto contenido de herbáceas. El suelo de esta zona se corresponde a un Cambisol tipo Dístrico.
- *Chapinería (Madrid)*: dehesa con carga bovina, compuesta por árboles de encina y enebro, así como una alta cobertura herbácea. El suelo de esta zona se corresponde a un Cambisol tipo Dístrico.
- *Plasencia (Extremadura)*: dehesa con una alta carga bovina. En el momento del muestreo mostraba claros síntomas de decaimiento, con encinas liquenizadas

## MATERIAL Y MÉTODOS

en sus copas. En esta zona de muestreo, había una alta densidad de jaras y alcornoques. El suelo de esta zona se corresponde a un Cambisol tipo Eútrico.

- *Talavera de la Reina (Castilla-La Mancha)*: bosque abierto compuesto por encinas y enebros, utilizado actualmente con fines cinegéticos. Las encinas de esta zona se caracterizan por tener un tamaño medio y estar rodeadas por poco sustrato vegetal. El suelo de esta zona se corresponde a un Luvisol tipo Vértico.
- *Sevilla (Andalucía)*: bosque abierto compuesto por encinas y alcornoques. Esta zona se caracteriza por tener una alta cantidad de cobertura arbustiva alrededor de las encinas. El suelo de esta zona se corresponde a un Cambisol tipo Eútrico.
- *Pamplona (Navarra)*: bosque abierto compuesto únicamente por encinas y una alta cantidad de cobertura arbustiva. El suelo de esta zona se corresponde a un Cambisol tipo Cálculo.
- *Formiche Bajo (Aragón)*: bosque abierto compuesto por encinas, enebros y pinos (*Pinus sylvestris*). Los árboles de esta zona se sitúan sobre una ladera, que se caracteriza por su alta pedregosidad y cobertura arbustiva. El suelo de esta zona se corresponde a un Cambisol tipo Cálculo.
- *Granada (Andalucía)*: bosque abierto compuesto por encinas y pinos, utilizado actualmente con fines cinegéticos. Las encinas de esta zona se caracterizan por ser de un tamaño medio y estar rodeadas de zonas sin cobertura vegetal. El suelo de esta zona se corresponde a un Cambisol tipo Cálculo.
- *Lleida (Cataluña)*: bosque compuesto únicamente por encinas, caracterizadas por una alta cobertura herbácea a su alrededor. El suelo de esta zona se corresponde a un Cambisol tipo Cálculo.
- *Ciudad Real (Castilla-La Mancha)*: bosque cerrado compuesto de encinas y quejigos (*Quercus faginea*) y una alta carga cinegética. Los árboles de este bosque están situados en una ladera y se caracterizan por tener poca cobertura vegetal a su alrededor. El suelo de esta zona se corresponde a un Cambisol tipo Eútrico.
- *Guadalajara (Castilla-La Mancha)*: bosque cerrado compuesto únicamente por encinas, caracterizadas por estar rodeadas de una alta cobertura arbustiva. El suelo de esta zona se corresponde a un Cambisol tipo Eútrico.
- *Alcoy (Alicante)*: bosque cerrado situado en el Parque natural de la Font Roja y compuesto por encinas, pinos y quejigos. Los árboles de este bosque se



sitúan sobre una ladera caracterizada por tener poca cobertura de herbáceas y arbustos. El suelo de esta zona se corresponde a un Cambisol tipo Cálculo.

### **Climatología de los sitios de muestreo**

Los datos climáticos utilizados para este estudio fueron extraídos de la base de datos de Felicísimo et al. (2011). Debido a la escasez de estaciones climáticas lo suficientemente cercanas como para obtener unos datos fiables, se decidió por la utilización de esta base de datos. Felicísimo et al. (2011) desarrolló una base de datos con una serie climatológica que transcurre desde 1950 hasta 2007, interpolando los datos de las estaciones climáticas existentes con una resolución espacial de 1 km. Aunque la serie de datos termina en 2007 y nuestro muestreo se realizó en 2015, se decidió la utilización de esta base de datos debido a la resolución espacial que posee. Además, el cálculo de la temperatura (MAT) y precipitación (MAP) media anual a partir de esta base de datos, representa la climatología histórica transcurrida en cada zona de muestreo.

De este modo, las zonas de muestreo se caracterizan por tener un amplio gradiente climático, abarcando desde climas oceánicos (Pamplona, Navarra) hasta semiáridos (Alcoy, Alicante), siendo predominante el clima mediterráneo, caracterizado por sus veranos secos y calurosos y precipitaciones concentradas principalmente en primavera y otoño.

### **Recogida de muestras de suelo**

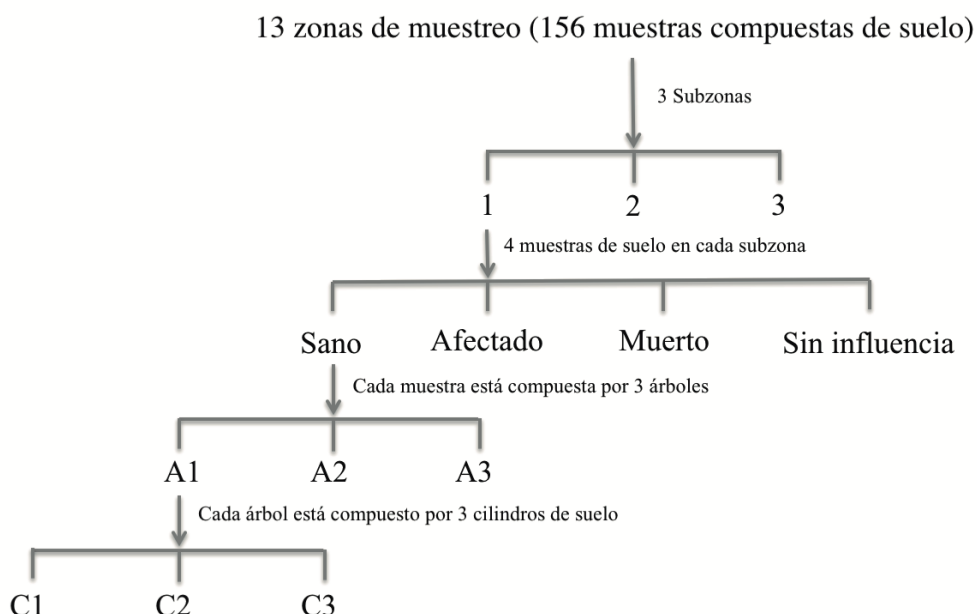
Las muestras de suelo se recogieron bajo la influencia de la encina, teniendo en cuenta una distancia máxima de 50 cm de su tronco, para los diferentes estados de salud que presentaba (encinas sanas, afectadas, muertas); así como, fuera de la influencia del árbol (suelo desnudo, *bulk soil*). Se tomaron un total de 156 muestras de suelo. Para abarcar la amplia heterogeneidad que se encuentra en el ecosistema suelo, se decidió hacer muestras compuestas para cada estado de salud y suelo desnudo en cada subzona de muestreo. De este modo, en cada subzona, tenemos 3 muestras compuestas de suelo bajo la influencia de árboles sanos, afectados y muertos; y una muestra compuesta de suelo fuera de la influencia de la encina (Figura 9).

Cada una de estas muestras está compuesta por 3 árboles distintos, o 3 zonas fuera de influencia de la encina distintas. A su vez, cada árbol, se compone de 3 muestras de suelo; las cuales se tomaron con cilindros de acero inoxidable de 5 cm de diámetro y

## MATERIAL Y MÉTODOS

10 cm de altura; lo que nos permite conocer la densidad aparente (*bulk density*) del suelo.

Una vez recogidas las muestras de suelo (156 muestras en total), se mantuvieron en una nevera a 4 °C hasta llegar al laboratorio, donde se separó una alícuota de unos 10 g de suelo homogeneizado de cada muestra para su análisis metagenómico; estas muestras fueron almacenadas a -20 °C hasta su utilización. El resto de las muestras del suelo se homogeneizó, se dejó secar al aire libre y se pasó por un tamiz de 2 mm de grosor. Después de esto, las muestras se almacenaron en oscuridad, en un lugar seco, hasta su posterior utilización.



**Figura 9.** Esquema de la recogida de muestras de suelo realizado en cada zona de muestreo.

### Análisis físico – químico de las muestras de suelo

Las muestras de suelo pre-procesadas y almacenadas en oscuridad sirvieron para calcular las características físico-químicas del suelo, así como la mineralización del C y N. Para esta primera parte, las muestras se enviaron al Servicio de Suelos, Plantas y Aguas del Instituto de Ciencias Agrarias (ICA – CSIC), donde se calcularon las siguientes variables:

- *pH*: el pH se calculó mediante el método de la pasta saturada (Kalra, 1995). En este método se coloca una cantidad de suelo (5 gramos) en un cono de saturación, añadiéndose agua destilada lentamente y amasándose hasta que se obtiene una pasta homogénea. Una vez obtenida la pasta saturada, se midió el pH usando el pHmetro CRISON micropH 2001 (Hach Lange Spain, S.L.U., Barcelona, SP).
- *Carbono y Nitrógeno total*: se calculó la cantidad de C y N total mediante un analizador elemental (Thermo Flash 2000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, 220 MA, USA). Esta técnica está basada en la oxidación completa e instantánea de la muestra de suelo a una temperatura aproximada de 1000 °C. Los productos de esta oxidación son reducidos y separados en una columna cromatográfica; transfiriéndose finalmente a un detector de conductividad térmica.
- *Carbonatos (CaCO<sub>3</sub>)*: se utilizó el método de Bernard (Demolon and Leroux, 1952; Allison and Moodie, 1965), mediante el cual se extrae el contenido de carbonatos al tratar las muestras de suelo con ácido clorhídrico utilizando un calcímetro de Bernard. A partir de la fracción de C de los carbonatos se calculó el contenido de C inorgánico de las muestras mediante la fórmula:

$$C \text{ inorganico} = \frac{CaCO_3 * \text{Peso molecular del Carbono}}{100}$$

- *Carbono orgánico del suelo (COS)*: el COS se calculó como la diferencia entre el C total y el C inorgánico proveniente de los carbonatos del suelo.
- *Nitrógeno inorgánico del suelo*: el nitrógeno inorgánico del suelo [amonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup> - N) y nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup> - N)] se extrajo con una solución 1:2 de suelo seco y cloruro potásico 2M, respectivamente, agitándolo durante 1h a 170 rpm en un agitador orbital para después filtrar la solución en un papel de filtro Whatman no. 42. Tras esto, se utilizó el método Kjeldahl (Kjeldahl, 1883) para su cuantificación.
- *Fósforo total y fósforo biodisponible (Av P)*: se utilizó el método de Burriel – Hernando debido a su gran sensibilidad en suelos calizos de pH alcalino (Burriel and Hernando, 1950). Este método utiliza una solución extractora a partir de Carbonato cálcico, Carbonato magnésico, Ácido acético y ácido sulfúrico al 20%, teniendo que estar el pH comprendido entre 3.2 y 3.3.
- *Concentración de cationes (Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>)*: para medir los cationes de las muestras de suelo se utilizó la metodología de los Métodos oficiales de análisis,

## MATERIAL Y MÉTODOS

tomo III (M.A.P.A., 1986); mediante la cual se extraen los cationes con una solución de acetato amónico 1N y pH 7 y se cuantifican con un espectrómetro de plasma ICP OES (PerkinElmer 4300 DV, PerkinElmer Inc., Wellesley, MA, USA).

Los resultados obtenidos de las variables físico-químicas se normalizaron utilizando el bulk density de cada muestra a área (m<sup>2</sup>) y 10 cm de profundidad (McKenzie et al., 2004)

### **Mineralización del Carbono y Nitrógeno del suelo**

La mineralización del C y N del suelo se realizó para obtener una imagen sobre la funcionalidad de las comunidades microbianas del suelo.

#### **Mineralización del Carbono**

La mineralización del C se midió como la respiración heterotrófica del suelo ( $R_H$ ). Para esto, añadimos 40 g de suelo seco en un vaso de cristal con un volumen de 150 mL y rehidratamos el suelo hasta alcanzar una capacidad de retención de agua (WHC) del 40%. La capacidad de retención de agua de un suelo es la cantidad de agua que puede retener dicho suelo después de haber sido saturado y dejado drenar durante 12 h. Rutinariamente, se utiliza un porcentaje del 60% de WHC; pero, ya que nuestras muestras pertenecen al clima mediterráneo, caracterizado por sus altas sequías en verano, rebajamos la cantidad de WHC a un 40% para simular las condiciones de campo (Lucas-Borja et al., 2016). Tras rehidratar los suelos y para evitar posibles ruidos de lectura debido al efecto Birch (Birch, 1958), incubamos las muestras de suelo durante 48 h en cámaras de ambiente controlado (SANYO MLR – 351H, Panasonic Corp, Kadoma, JP), examinando que el contenido de agua se mantuviera constante. Tras esto, las muestras de suelo se incubaron a diferentes temperaturas siguiendo un gradiente variable desde 5 a 35 °C, siendo este rango de temperaturas común en climas mediterráneos. La  $R_H$  se midió cada 10 °C (medidas a 5, 15, 25 y 35 °C), esperando entre cada medida hasta que se alcanzaba la temperatura deseada. La medición se realizó durante 60 segundos con un EGM-4 (PP systems, MA, USA). Este instrumento es un analizador de gases en el infrarrojo portable que permite cuantificar las partes por millón (ppm) de CO<sub>2</sub> emitidas desde el suelo. Esta medición se lleva a cabo gracias a la capacidad de absorción que poseen los gases con moléculas diatómicas en el rango infrarrojo. Para

cuantificar y extrapolar el incremento en las ppm de CO<sub>2</sub> a masa de carbono utilizamos la siguiente ecuación:

$$m = \frac{slp * M * P * V}{R * T}$$

Donde,  $m$  es la masa de C;  $slp$  es la pendiente del incremento neto de CO<sub>2</sub> en 60 segundos;  $M$  es la masa atómica del C ( $\text{g} \times \text{mol}^{-1}$ );  $P$  es la presión del aire (ATM);  $V$  es el volumen no ocupado por el suelo del vaso de cristal (L);  $R$  es la constante universal de los gases ideales ( $0.08206 \text{ ATM} \times \text{L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{K}^{-1}$ ); y  $T$  es la temperatura del suelo (K) en el momento de la medida.

Para cubrir la variabilidad de la  $R_H$  que se encuentra comúnmente en el clima mediterráneo debido a los cambios en la temperatura ambiental, la respiración heterotrófica utilizada en esta tesis doctoral está compuesta por la media aritmética de las cuatro temperaturas calculadas. Además, como medida adicional, se calculó el intercambio de materia orgánica del suelo ( $C$  turnover), estimándose como la  $R_H$  por unidad de carbono orgánico (Curiel Yuste et al., 2007).

Al igual que en las variables físico-químicas, la  $R_H$  se normalizó a área ( $\text{m}^2$ ) y 10 cm de profundidad ( $\text{g CO}_2 \text{ h}^{-1} \text{ m}^{-2}$ ).

### Mineralización del Nitrógeno

La mineralización del N se calculó a partir de los procesos de amonificación ( $R_{amm}$ ) y nitrificación ( $R_{nit}$ ) neta. Al igual que en la mineralización del C, los suelos se rehidrataron hasta alcanzar un 40% de su WHC y se incubaron durante 15 días en una cámara de ambiente controlado (SANYO MLR – 351H, Panasonic Corp, Kadoma, JP) a una temperatura variable entre 5 y 35 °C, con variaciones de 10 °C cada 6 horas, y una humedad relativa del 80%. Durante estos días, se prestó especial atención al contenido de hídrico de las muestras, manteniendo su WHC en un 40% de su capacidad.

Una vez terminada la incubación, se calculó la amonificación y nitrificación neta como la cantidad de amonio y nitrato, respectivamente, acumulado durante los 15 días de incubación:

$$R_{amm} = ((\text{NH}_4^+ - N)_{15} - (\text{NH}_4^+ - N)_0) / \Delta t$$

$$R_{nit} = ((\text{NO}_3^- - N)_{15} - (\text{NO}_3^- - N)_0) / \Delta t$$

## MATERIAL Y MÉTODOS

Donde,  $\Delta T$  representa el tiempo de incubación;  $(NH_4^+ - N)_0$  y  $(NO_3^- - N)_0$  representa el contenido de amonio y nitrato al comienzo de la incubación; y  $(NH_4^+ - N)_{15}$  y  $(NO_3^- - N)_{15}$  representa el contenido de amonio y nitrato al finalizar la incubación, respectivamente.

La amonificación y nitrificación neta se normalizó a área ( $m^2$ ) y 10 cm de profundidad ( $kg R_{amm} day^{-1} m^{-2}$ ,  $kg R_{nit} day^{-1} m^{-2}$ , respectivamente).

### **Cálculo de la biomasa microbiana (método SIR)**

La biomasa microbiana de las muestras del suelo se calculó utilizando el método de la respiración inducida por sustrato (Substrate-induced respiration – SIR) de Anderson and Domsch (1978). Este método estima la biomasa microbiana viva de la muestra mediante la medida de la respuesta respiratoria máxima de la muestra de suelo tras añadir un exceso en la fuente de C (glucosa). Para esto, se cogieron 10 g de suelo seco y se rehidrataron hasta un 40% de su WHC. Después, se incubaron los suelos durante 48 h en una cámara ambiental (20 °C y 80% de humedad relativa), controlando la cantidad de agua en cada muestra, facilitando la activación de las comunidades microbianas del suelo. Una vez el suelo estuvo activo, se adicionó 0.5 g de glucosa por kg de suelo seco y se incubó durante dos horas a 30 °C (tiempo en el cual alcanza la máxima capacidad respiratoria antes de que la biomasa microbiana aumente). Tras dos horas de incubación, se midió la respiración máxima del suelo mediante un EGM-4 (PP systems, MA, USA) durante 60 segundos, utilizándose la fórmula del apartado “Mineralización del Carbono”.

## Extracción de ADN de las muestras de suelo

### Extracción de ADN

La extracción del ADN se llevó a cabo a partir de las muestras de suelo congeladas a -20 °C. Tras su descongelación a temperatura ambiental, se utilizó el “PowerSoil DNA Isolation Kit” de MoBio siguiendo las instrucciones del fabricante:

- Añadir 0.25 gramos de muestra de suelo a un “PowerBead Tube” y agitar suavemente. Los “PowerBead Tubes” contienen un tampón que ayuda a la dispersión de las partículas de suelo, las cuales empiezan a disolver los ácidos húmicos y protegen los ácidos nucleicos de la posible degradación.
- Adicionar 60 µl de la solución C1 y agitar suavemente para mezclarlo bien. La solución C1 contiene SDS y otros agentes químicos que ayudan a la lisis celular.
- Asegurar el cierre de los “PowerBead Tubes” y agitar durante 10 minutos a máxima velocidad en un adaptador de vórtex horizontal. Este paso es crítico para una correcta homogeneización y lisis celular. Las células se rompen gracias a la acción de los agentes químicos, así como a la agitación de las bolitas de cristal.
- Centrifugar los tubos a 10000 x g durante 30 segundos a temperatura ambiente.
- Transferir el sobrenadante (400 – 500 µl) a un tubo eppendorf limpio. El sobrenadante puede contener todavía algunas partículas de suelo, manteniendo una tonalidad oscura.
- Añadir 250 µl de solución C2 y agitarlo durante 5 segundos; tras esto se incubaba a 4 °C durante 5 minutos. La solución C2 contiene un reactivo que hace precipitar el material orgánico e inorgánico que no sea ADN, como por ejemplo sustancias húmicas, proteínas o residuos celulares.
- Centrifugar los tubos a 10000 x g durante 30 segundos a temperatura ambiente.
- Evitando el pellet que se forma en el tubo eppendorf, transferir unos 600 µl de sobrenadante a un tubo limpio. Este pellet está compuesto por el material orgánico e inorgánico que elimina la solución C2.
- Adicionar 200 µl de solución C3 y agitar suavemente. Incubar de nuevo los tubos a 4 °C durante 5 minutos. La solución C3 es un segundo reactivo que

## MATERIAL Y MÉTODOS

ayuda a precipitar de nuevo las posibles impurezas, facilitando la pureza del ADN.

- Transferir el sobrenadante (750 µl aproximadamente) a un eppendorf limpio, evitando arrastrar parte del pellet.
- Añadir 1200 µl de solución C4 y agitar durante 5 segundos. La solución C4 es una solución salina de alta concentración, lo que permite una unión firme del ADN a la membrana de las columnas de sílica que se usa en los siguientes pasos, descartando de este modo posibles contaminantes.
- Cargar aproximadamente 675 µl en un “Spin filter” (columnas de sílica) y centrifugar a 10000 x g durante 60 segundos a temperatura ambiente. Descartar el eluido que ha atravesado la columna y repetir el proceso 3 veces en la misma columna hasta agotar el sobrenadante obtenido en el paso anterior. En este punto, el ADN de las muestras se encuentra unido a las columnas de sílica.
- Adicionar 500 µl de solución C5 y centrifugar a temperatura ambiente durante 30 segundos a 10000 x g. La solución C5 es una solución de lavado basada en etanol. El etanol ayuda a limpiar la membrana de posibles sales residuales, ácidos húmicos y otros contaminantes; permitiendo a su vez que el ADN quede unido en la columna de sílica.
- Descartar el eluido.
- Centrifugar otra vez a temperatura ambiente durante 60 segundos a 10000 x g, para eliminar el etanol que pueda quedar en la columna.
- Con cuidado, traspasar la columna de sílica a un eppendorf limpio, evitando cualquier contacto con la solución C5 del eppendorf anterior.
- Añadir 100 µl de solución C6 (tampón de elución Tris 10 mM) en el centro de la membrana de la membrana.
- Centrifugar a temperatura ambiente durante 30 segundos a 10000 x g para liberar el ADN adherido a la columna de sílica.
- Descartar la columna de sílica (Spin filter).
- Guardar el ADN a -20 °C.



### **Electroforesis en geles de agarosa**

Para comprobar la pureza del ADN extraído, se realizó una electroforesis horizontal en geles de agarosa al 0.8% en tampón TAE 1x [TrisHCl 40 mM, EDTA-Na<sub>2</sub> 2 mM, ácido acético glacial 0,1142 % (v/v)]. Los geles se pusieron en una cubeta de la marca BioRad y como tampón de carga se utilizó una solución 6x de 0.25% (p/v) de azul de bromofenol y glicerol 45% (v/v); el voltaje utilizado para este análisis fue de 120 V.

El revelado de los geles de agarosa se llevó a cabo por inmersión en una solución de bromuro de etidio 1 mg/mL en agua durante 15 minutos. El bromuro de etidio facilita la visualización del ADN de los geles de agarosa gracias a que se intercala entre las bases nitrogenadas del ADN, iluminándose al ser irradiado con luz ultravioleta.

### **Cuantificación de la concentración de ADN**

La cuantificación de la concentración de ADN de las muestras de suelo se realizó con la herramienta Qubit 3.0 (Invitrogen, CA, USA). El Qubit es un espectrofotómetro que utiliza fluorocromos para medir la fluorescencia emitida por los ácidos nucleicos (ADN o ARN) o proteínas y compararla con una recta patrón, cuantificando, de este modo, la concentración que se encuentra en cada muestra. Una de las ventajas de esta herramienta es que permite trabajar con volúmenes de muestras bajos (1 µl a 20 µl), obteniendo unas concentraciones en un rango muy amplio (0.2 ng/µl a 1 µg/µl).

### **Amplificación del ADN**

Una vez extraído y cuantificado el ADN, las muestras se enviaron al Research Technology Support Facility de la Michigan State University (MSU) donde se llevó a cabo su amplificación.

El primer paso que se hizo en este centro fue la creación de las librerías de los amplicones, para lo cual se utilizó la estrategia de indexación dual desarrollada por Kozich et al. (2013). Los cebadores que se utilizaron para la amplificación de las muestras de suelo fueron: para bacteria, cebadores 515F-Y y 926R descritos por Parada et al. (2016) que amplifican a la región hipervariable V4-V5 del gen 16S rRNA; y para hongos, cebadores ITS1FI2 e ITS2 descritos por Schmidt et al. (2013) que amplifican la región del espacio intergénico ITS1 (Tabla 2).

## MATERIAL Y MÉTODOS

Para la creación de las librerías, los cebadores universales se unieron a los adaptadores (Fluidigm CS1/CS2 – Tabla 2), necesarios para la amplificación mediante Illumina. El protocolo de indexación dual requiere, además del adaptador y los cebadores, una secuencia de 8 nucleótidos denominados *barcodes* o códigos de barras necesaria para el demultiplexado de las muestras; una secuencia de acolchamiento (*pad sequence*) de 10 nucleótidos necesaria para una correcta temperatura de melting entre 60 y 65 °C; y una secuencia de 2 nucleótidos que actúa de unión (*linker*) entre el cebador y los adaptadores.

**Tabla 2.** Cebadores utilizados para la amplificación de las bacterias y hongos de las muestras de suelo.

Cebadores	Secuencia	Tamaño	Región
CS1- 515F-Y	ACACTGACGACATGGTTCTACA+ GTGYCAGCMGCCGCGGTAA	41 pb	Bacteria V4
CS2- 926R	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCT+ CCGYCAATTYMTTTRAGTTT	42 pb	Bacteria V5
CS1- ITS1FI2	ACACTGACGACATGGTTCTACA+ GAACCWGCCGARGGA TCA	40 pb	Hongos ITS1
CS2- ITS2	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCT+ GCTGCGTTCTTCATCGATGC	42 pb	Hongos ITS1

Tras la segunda PCR necesaria para la creación de estas librerías, cada colección de librerías se normalizó usando las placas de normalización Invitrogen SequalPrep DNA (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Posteriormente, los productos de PCR normalizados se mezclaron para su cuantificación y comprobación de su calidad, tras lo cual se cargaron en el secuenciador Illumina MiSeq v2 y se secuenciaron siguiendo la estrategia PE250, usando un kit de reacción v2 500 cycle. Es decir, la obtención de dos secuencias pareadas (*forward* y *reverse*) de un tamaño de 250 bp cada una. La asignación de bases (*Base calling*) se llevó a cabo mediante Real Time Analysis (RTA) v.1.18.54, tras lo cual el producto resultante del RTA se demultiplexó y convirtió a formato FastQ (archivo que contiene el nombre de cada secuencia, la calidad de cada secuencia y la secuencia de bases) con el programa Illumina Bcl2fastq v.2.18.0.

### Análisis bioinformático

Una vez se secuenciaron las muestras de suelo, el servicio de secuenciación de la MSU nos envió los archivos FastQ de cada muestra. La secuenciación de cada muestra estaba compuesta por dos archivos FastQ, uno para cada cebador (*forward* y *reverse primer*). El análisis bioinformático de las muestras se llevó a cabo mediante la plataforma Qiime 1.9.1 (Caporaso et al., 2010). Para comprobar la calidad de las

lecturas, así como para unir las secuencias *paired-end* en un mismo archivo, hubo que realizar una serie de pasos previos.

### Comprobación de la calidad de lecturas mediante FastQC

El primer paso que se llevó a cabo fue la comprobación de la calidad de las lecturas de los archivos FastQ con el programa FastQC (Andrews, 2010). En un primer momento, se comprobó la calidad de las lecturas de algunas muestras por separado; y posteriormente, se comprobó la calidad de las lecturas de todos los archivos referentes a la sección R1 (*forward primer*) y R2 (*reverse primer*) juntos. FastQC muestra información acerca de algunos parámetros básicos de las secuencias (número total de secuencias, tamaño de las secuencias, tipo de secuenciación utilizada...) y otros de mayor interés, como los valores de calidad (*Quality scores*) de cada base. Estos valores de calidad permiten eliminar las bases que presentan una calidad baja debida a una mala secuenciación.

En nuestro caso, tuvimos que eliminar 10 bases de la región final de R1 en los FastQ de bacterias y hongos; así como, 50 bases de la zona final de R2 en bacterias y 20 bases en hongos. Este procedimiento se llevó a cabo con la herramienta fastx\_trimmer ([http://hannonlab.cshl.edu/fastx\\_toolkit/commandline.html](http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/commandline.html)), utilizando el script que se adjunta a continuación (ejemplo para el forward primer):

```
#!/bin/bash
# Created by Daniel Garcia Angulo:
# use trimmomatic to remove possible Illumina adapters and filter by sequences with low quality score -
requires name list (file <list.txt> in same folder as this script) of forward reads only.
# Steps:
    # Create new directory for output files
    # Remove useless output, the directory would have only the output for next step (pandaseq). This
output would be the filtered samples, and the "unpaired" samples would be removed.
    # To create log file use the command as: ./trimmomatic_multiples_files.sh list.txt 2>
trimmomatic_log.txt

mkdir ./R1_trimmed

for file in $(<list_R1.txt)
do

    /home/fastx_trimmer -f 1 -l 240 -i ${file%_R1_001.fastq}_R1_001.fastq -o
R1_trimmed/${file%_R1_001.fastq}_R1_001.fastq -Q5
done
```

### Solapamiento de los archivos FastQ

El solapamiento de las secuencias *paired-end* (*overlapping*) se realizó con la herramienta PANDaseq (PAired-eND Assembler for DNA sequences) (Bartram et al., 2011). Esta herramienta permite unir dos archivos FastQ en uno sólo, siempre y cuando tengan un número de bases por las cuales puedan solapar. En bacterias, se utilizó un solapamiento de 25 pares de bases; mientras que, en hongos 75 pares de bases; en ambos casos, el umbral de la calidad de solapamiento se mantuvo al 90%, permitiendo de este modo un 10% de disparidad entre los pares de bases. El script utilizado se presenta a continuación:

```
#!/bin/bash
# use pandaseq to merge reads - requires name list (file <list.txt> in same folder as this script) of forward
and reverse reads to be merged using the panda-seq program
# Modified by Daniel Garcia Angulo:
# Create directories with sample name
# Options: -F: fastq output, -N: remove Ns reads, -L: maximum length, -o: bp overlapping, -t:
threshold
# Same name in the output for next step is required
# Remove useless directories and logs

mkdir ./pandaseq_merged_reads
mkdir ./pandaseq_merged_reads/log

for file in $(<list.txt)
do
    mkdir ./pandaseq_merged_reads/${file%_R1_001.fastq}

    pandaseq -f ${file%_R1_001.fastq}_R1_001.fastq -r ${file%_R1_001.fastq}_R2_001.fastq -w
pandaseq_merged_reads/${file%_R1_001.fastq}/fastqjoin.join.fastq -g
pandaseq_merged_reads/log/${file%_R1_001.fastq}.log -F -N -L 500 -o 75 -t 0.9 -l 200

done

rm -r ./pandaseq_merged_reads/*_R2_*
rm ./pandaseq_merged_reads/log/*_R2_*
```

### Procesamiento de las secuencias solapadas con Qiime 1.9.1

Tras realizar el solapamiento de las muestras se utilizó la herramienta Qiime 1.9.1 (Caporaso et al., 2010) para seguir con el procesado de las muestras desde la eliminación de los cebadores hasta el agrupamiento de las secuencias (*clustering*).

#### Extracción de los cebadores de las muestras solapadas

La eliminación de los cebadores es un paso importante en el procesamiento de las secuencias, ya que son secuencias no hipervariables y que, por tanto, podrían generar

ruido en el paso final (*clustering* de las secuencias). Para la extracción de los cebadores, se utilizó el script *multiple\_extract\_barcodes.py* de Qiime 1.9.1.

### **Comprobación de la calidad de las muestras**

Una vez terminado el pre-procesado de las secuencias, se llevo a cabo una comprobación y filtrado de acuerdo con la calidad de las secuencias. El script *multiple\_split\_libraries\_fastq.py* se utilizó para filtrar las secuencias de baja calidad, eliminando todas aquellas que presentaban un nivel de calidad Phred menor al establecido en el archivo de parámetros.

El nivel de calidad Phred (Q) es una medida que nos indica la calidad en la identificación de las secuencias de bases de nuestras muestras; y se define como el logaritmo de las probabilidades de error que tienen dichas bases (P):

$$Q = \log_{10} P$$

Para este análisis se ha utilizado una calidad Q20 en bacterias y Q30 en hongos, lo que se traduce en una precisión del 99% en bacterias, y 99.9% en hongos, de que la secuencia de bases sea correcta. Por último, este script agrupa todas las muestras en un único archivo del formato fasta, en el cual aparece el nombre de cada secuencia, la muestra a la que pertenece y la secuencia de bases.

### **Identificación y eliminación de las secuencias quimera**

Uno de los problemas que se generan al realizar secuenciación masiva es la aparición de quimeras. Las secuencias quiméricas son artefactos creados por la reacción de la PCR, mediante la cual se produce una amplificación incompleta del amplicón. Este amplicón puede ser utilizado en los ciclos posteriores como cebador, causando amplicones con orígenes diferentes en parte de su secuencia. El análisis y eliminación de este tipo de secuencias es muy importante en secuenciación masiva ya que puede llevar a una identificación incorrecta de los amplicones, y por tanto a una adscripción taxonómica errónea o inexistente.

Para la identificación de este tipo de estructuras, se utilizó el script *identify\_chimeric\_seqs.py*, el cual utiliza la herramienta usearch v.5.2.236 (Edgar, 2014). Debido a la limitación de memoria en la versión gratuita de 32-bit, se utilizó la opción *split\_by\_sampleid*, lo que permite realizar el análisis dividiendo el archivo por muestra,

## MATERIAL Y MÉTODOS

de manera interna, y analizándolo muestra a muestra. La base de datos que se utilizó como base de referencia para la identificación de estas quimeras fue la RDP gold database en el caso de bacterias y UNITE chimera database para los hongos.

Una vez identificadas las quimeras, se utilizó el script *filter\_fasta.py* para comparar las secuencias del archivo original con el archivo que contenía las quimeras; creando de este modo un archivo nuevo libre de estos artefactos de secuenciación.

### **Clustering de los datos metagenómicos y asignación de OTUs.**

Para el paso final del análisis bioinformático de las muestras de datos metagenómico se usó el script *pick\_open\_reference\_otus.py*. Este script está dividido en varias partes, 4 pasos relacionados con el *clustering* y la asignación de OTUs (Unidad Taxonómica Operacional) y 2 pasos relacionados con la creación de la tabla de OTUs y los árboles filogenéticos.

- En el primer paso, se produce el *clustering* de las secuencias con la base de datos de referencia elegida (“closed reference OTU”), asignando las OTUs ya existentes. Las bases de datos de referencia utilizadas fueron:
  - Ribosomal Database Project (RDP database) (Cole et al., 2014) para bacterias.
  - UNITE database para hongos (Nilsson et al., 2018).

En este primer paso, las secuencias que no han sido asignadas a un OTU, son filtradas del archivo, creando un fichero nuevo donde las secuencias son sub-muestreadas aleatoriamente.

- En el segundo paso, las secuencias sub-muestreadas son agrupadas “*de novo*”. Este tipo de *clustering* no usa ninguna base de datos de referencia externa, sino que realiza un agrupamiento entre las secuencias. Cada centroide de los *clustering* es entonces elegido como una secuencia de referencia nueva (“new reference sequence”), que se utilizará en el siguiente paso como referencia.
- En el tercer paso, se vuelve a realizar un “closed reference OTU” utilizando como base de referencia las “new reference sequences” creadas en el paso anterior. De la misma manera que en el primer paso, las secuencias que no han sido asignadas a un OTU son transferidas a un nuevo archivo.
- En el cuarto paso, se produce un segundo agrupamiento “*de novo*” y un nuevo “closed reference OTU” con las secuencias que no han sido asignadas todavía a un OTU.

- En el quinto paso, se producen las tablas de OTU (*otu\_table*), concatenando los archivos producidos en los pasos 1, 3 y 4; y añadiendo la taxonomía a cada secuencia representativa.
- En el sexto y último paso, se crea el árbol filogenético; siempre y cuando la opción *suppress\_align\_and\_tree* no haya sido seleccionada. Esta opción es muy importante ya que debe utilizarse cuando se realiza el *clustering* de hongos.

### **Análisis de las comunidades microbianas del suelo**

Una vez obtenida la tabla de OTUs y la taxonomía de cada OTU, el archivo se trasladó al programa estadístico R v.3.5.1 (R Core Team, 2016), donde se realizaron todos los análisis referentes a las comunidades bacterianas y fúngicas del suelo.

### **Pre-procesado de las muestras microbianas del suelo**

Antes de realizar los análisis exploratorios y estadísticos de los datos, se llevó a cabo un pre-procesamiento para eliminar el ruido que se produce en este tipo de datos.

- El primer paso, que se llevó a cabo fue la eliminación de los *singletons*. Los *singletons* son lecturas que se presentan una sola vez a lo largo de todas las muestras.
- *Good's coverage*, índice que estima la proporción de OTUs observados respecto al total de OTUs de la población, es decir la cobertura que hemos obtenido del total de la población. La *Good's coverage* se estimó mediante la siguiente ecuación:

$$G = 1 - \frac{n}{N}$$

Donde, *G* es la *Good's coverage*; *n* es el número de *singletons* que existen en cada muestra (diferentes a los *singletons* eliminados en el paso anterior, ya que estos *singletons* son muestrales y no totales), *N* es el número de secuencias totales de cada muestra.

- Curvas de rarefacción, es una técnica que nos ayuda a comprobar si el muestreo se ha llevado a cabo de manera correcta. Se define como el cambio esperado en la riqueza de especies de acuerdo al tamaño de la muestra. Se calculó siguiendo la ecuación (Fernandez et al., 2001):

$$E(Sn) = \sum_{i=1}^N \left[ 1 - \frac{\left( \frac{N - N_i}{n} \right)}{\left( \frac{N}{n} \right)} \right]$$

## MATERIAL Y MÉTODOS

Donde,  $E(Sn)$  es el número de especies deseado;  $N$  es el número total de individuos;  $N_i$  es el número total de individuos de un taxón  $i$ ; y  $n$  es una submuestra de  $N$ . Las gráficas obtenidas mediante esta fórmula muestran las curvas de rarefacción, las cuales tienden a ser asíntotas; en el caso de que no llegue a serlo la muestra debe eliminarse ya que el *clustering* de esa muestra no se ha llevado a cabo de manera correcta.

- Para eliminar el ruido restante, se llevó a cabo un último paso de filtrado. En este paso, se eliminaron las OTUs que tenían una baja representación y pudieran causar ruido al analizar las muestras. Para esto, utilizamos el método mostrado por Bokulich et al. (2013) en el cual se eliminan las secuencias que tienen una representación menor al 0.005% de las lecturas totales.
- Como paso adicional, en las comunidades fúngicas se realizó un paso previo, en el cual se eliminaron todas aquellas secuencias que pertenecían a otros reinos (ej. protistas y plantas).

Una vez se dispuso de una base de datos filtrada, se realizaron los análisis para la caracterización de las comunidades microbianas del suelo.

### **Asignación de los gremios fúngicos**

La herramienta FUNGuild (Nguyen et al., 2016) se utilizó para la asignación de los diferentes gremios fúngicos. Esta herramienta compara la taxonomía obtenida en el clustering con una base de datos conocida; asignando, de este modo, los gremios a los que pertenecen los diferentes hongos. FUNGuild es una herramienta que permite comprender la funcionalidad de las comunidades fúngicas, diferenciando hongos según: hongos saprótrofos, hongos ectomicorrícicos, hongos endomicorrícicos, patógenos de plantas, etc; lo que ayuda a comprender la funcionalidad del ecosistema suelo.

### **Diversidad de las comunidades microbianas del suelo**

La diversidad microbiana puede estimarse a partir de diferentes índices. En esta tesis doctoral, los índices de diversidad microbiana se calcularon para cada manejo (bosque, bosque abierto y dehesa). Además, dentro de cada uno de los diferentes usos del suelo, se calculó la diversidad microbiana para cada suelo bajo la influencia de las encinas (árboles sanos, afectados o muertos) y fuera de su influencia (suelo desnudo). Los índices de diversidad que se utilizaron para este estudio se explican a continuación:



- *Alfa diversidad*: se define como la riqueza de especies que hay en un hábitat determinado. Existen varios índices para su estimación:
  - *Índice de Shannon*: se le conoce también como el índice de Shannon-Weaver. Éste índice relaciona la cantidad de especies presentes con el número de individuos de cada una; además, asume que los individuos son seleccionados al azar y todas las especies están representadas en la muestra, midiendo el grado promedio de incertidumbre en la que una especie pertenecerá a un individuo escogido al azar (Magurran, 1988). La ecuación que utiliza es:

$$H' = - \sum p_i \ln p_i$$

Donde,  $H'$  es el valor del índice de Shannon; y  $p_i$  es la abundancia relativa del taxón  $i$ .

- *Índice de Simpson inverso*: mide la probabilidad de que dos individuos tomados al azar de una muestra sean de la misma especie. Las especies dominantes tienen una gran importancia en este índice ya que son más probables que aparezcan (Magurran, 1988). La ecuación que se utiliza es:

$$D = \sum p_i^2$$

Donde,  $D$  es el índice de Simpson; y  $p_i$  es la abundancia relativa del taxón  $i$ . Para facilitar la lectura se representa en su valor inverso:  $1/D$ .

- *Índice de equidad de Pielou*: mide la proporción de diversidad observada con relación a la máxima diversidad esperada. El valor de este índice oscila entre 0 y 1, donde el valor máximo corresponde a situaciones donde todas las especies son igual de abundantes (Magurran, 1988). La ecuación para calcularlo es:

$$J' = \frac{H'}{\ln S}$$

Donde,  $J'$  es el Índice de equidad de Pielou;  $H'$  es el índice de Shannon y  $S$  el número de taxones.

- *Beta diversidad*: se define como la diversidad que existe a lo largo de un gradiente o entre diferentes hábitats. Para su estimación se utilizaron las siguientes medidas:
  - *Índice de Bray - Curtis*: mide las similitudes entre dos hábitats basándose en las abundancias de cada especie presente. El valor de este índice oscila

## MATERIAL Y MÉTODOS

entre 0 y 1, donde el valor 0 corresponde a una composición de especies idéntica en los dos hábitats. La ecuación que utiliza es:

$$BC = 1 - \frac{2C}{A + B}$$

Donde, BC es la distancia de Bray - Curtis; A es el número de especímenes encontrados en la comunidad A; B es el número de especímenes encontrados en la comunidad B; y C es la suma de los valores menores de las especies encontradas en ambas comunidades.

- *Distancia weighted-UniFrac*: mide las similitudes entre dos hábitats teniendo en cuenta la abundancia relativa de los taxones/especies compartidos y su distancia filogenética. Para calcularlo se necesita un árbol filogenético, por lo que sólo puede utilizarse en bacterias. Su valor oscila entre 0 y 1, donde el valor 1 corresponde a una composición de especies idéntica en los dos hábitats. La ecuación que utiliza es:

$$W = \frac{\sum_{i=1}^N li \left| \frac{A_i}{A_T} - \frac{B_i}{B_T} \right|}{\sum_{j=1}^S L_j}$$

Donde,  $W$  es la distancia weighted-UniFrac;  $N$  es el número de nodos en el árbol filogenético;  $S$  es el número de secuencias que presenta el árbol filogenético;  $li$  es la longitud de la rama entre el nodo  $i$  y su “padre”;  $L_j$  es la longitud total desde la raíz hasta el final del árbol filogenético para cada secuencia  $j$ ;  $A_i$  y  $B_i$  son el número de secuencias de la comunidad A y B que desciende desde el nodo; y  $A_T$  y  $B_T$  son el número total de secuencias de las comunidades A y B.

- *Non-metric Multidimensional Scaling (NMDS)*: para visualizar los resultados de la beta diversidad se llevaron a cabo una serie de NMDS entre los diferentes manejos y los diferentes estados de salud de la encina. El NMDS es un análisis de escalamiento multidimensional cuyo objetivo principal es representar  $N$  objetos en un espacio dimensional reducido. Para poder utilizar este tipo de análisis, primero redujimos el número de lecturas de cada muestra a las lecturas de la muestra con menor valor mediante la función “rarefy” (Oksanen et al., 2019). Posteriormente, se calculó el NMDS a partir de las distancias weighted-Unifrac en bacterias y Bray-Curtis en hongos realizando 500 réplicas para conseguir la convergencia de los datos.

Una vez realizados los NMDS, se estimaron las diferencias significativas mediante un análisis PERMANOVA con la función adonis, utilizando como factor aleatorio la localización de cada zona de muestreo (“strata = localización”) (Oksanen et al., 2019).

### **Abundancia Relativa de las comunidades del suelo**

Para comprender la composición de las comunidades microbianas del suelo, así como sus disimilitudes en los diferentes usos del suelo y estados de salud del árbol, se realizó el cálculo de la abundancia relativa a nivel de filo. Esta medida se define como el porcentaje de individuos de cada especie, en nuestro caso de cada filo, en relación con el total que conforma la comunidad.

### **Valor indicador (IndVal) de las comunidades microbianas**

El valor indicador de las especies es un índice que estima los taxones que mejor caracterizan un conjunto de hábitats. En ecología, este índice tiene un gran valor al ser capaz de evaluar las especies importantes en cada ecosistema. Uno de los índices más comunes es el denominado IndVal descrito por Dufrêne and Legendre (1997).

La fórmula para calcular el IndVal es el producto de dos términos diferentes:

- Especificidad ( $A_{ij}$ ), se refiere al rendimiento de la especie  $i$  en términos de abundancia en todos los grupos.
- Fidelidad ( $B_{ij}$ ), se refiere al rendimiento de la especie  $i$  en términos de presencia-ausencia dentro del grupo de sitios  $j$ .

Siendo:

$$IndVal_{ij} = 100 A_{ij} B_{ij}$$

### **Core community de las comunidades microbianas del suelo**

Además de los estudios anteriores, en los que se analizaba la comunidad bacteriana y fúngica en una escala general (todas las OTUs encontradas en las zonas de muestreo), también se llevó a cabo un estudio más detallado del núcleo de la comunidad microbiana del suelo (*core community*). Para este estudio, se aplicaron una serie de filtros más restrictivos que los explicados anteriormente en el apartado 5.4.1. Primeramente, se separó el archivo original en 3 archivos diferentes, uno para cada manejo histórico. Posteriormente, se eliminaron todas aquellas secuencias con menos de 400 lecturas en bacterias y 200 lecturas en hongos. Además, como filtrado final, se eliminaron todas aquellas OTUs que no se detectaron en al menos 3 de las 4 localizaciones (5 en bosques abiertos) de cada manejo, eliminando así las muestras que estaban poco representadas en cada uno de ellos (Comte et al., 2016). Una vez realizado este filtrado previo, las OTUs encontradas en cada manejo histórico se redujo drásticamente, quedando, de este modo, el *core community* de la microbiota del suelo.

Una vez calculada la *core community* del suelo, se estimaron los índices de alfa y beta diversidad, así como el porcentaje de abundancia relativa a nivel de filo para cada comunidad microbiana (bacterias y hongos). Adicionalmente, se llevó a cabo un *Heatmap de correlaciones*. Para esto se utilizó la función “taxa.env.correlation” del paquete “microbiomeSeq” (Lahti and Shetty, 2017) para mostrar las posibles relaciones existentes entre los filos más abundante y las variables ambientales. Esta función utiliza correlaciones para relacionar la abundancia de cada taxón (a nivel de filo en nuestro caso) con los valores obtenidos para cada variable ambiental. Una de las ventajas de esta función es que permite elegir el coeficiente de correlación que se quiere computar (Pearson, Spearman o Kendall), devolviendo unos *p*-valores ajustados según las variables ambientales, siendo estos necesarios cuando se realiza un análisis de correlaciones múltiple.

### **Redes de co-ocurrencia de las comunidades microbianas del suelo**

Las redes de co-ocurrencia están basadas en la teoría de grafos, la cual se compone de en una serie de puntos denominados vértices o nodos (*nodes*) unidos entre sí por aristas (*edges*).

Las redes se pueden categorizar como:

- Redes directas (*directed networks/graphs*): grafos en los que las aristas tienen una dirección asociada (Ej. redes tróficas).
- Redes indirectas (*undirected networks/graphs*): grafos en los que todas las aristas son bidireccionales (Ej. redes de co-ocurrencia).

La estructura de ambas redes, se pueden caracterizar mediante una serie de parámetros:

- *Diámetro*: longitud (número de aristas) del camino geodésico más largo. Da una idea del tamaño de la red.
- *Camino más corto entre dos nodos (shortest path)*: camino con el mínimo número de aristas. Identifica la relación más estrecha entre dos nodos cualesquiera en la red.
- *Longitud media de los caminos (Average path length)*: definido como la longitud media de los caminos entre todos los pares de nodos. Da una idea del grado de interconexión de los nodos de la red.
- *Conectancia*: es la proporción entre el número de aristas y el número de nodos. Da una idea de la densidad de conexiones en la red.
- *Centralidad de Grado (degree - ND)*: medida de centralidad que estima el número de conexiones (aristas) que tiene un nodo. Mide el grado de generalidad del nodo, y de su capacidad para afectar al resto de nodos de la red.
- *Centralidad de enmediedad (betweenness - BC)*: una medida de centralidad que mide el número de veces que un nodo actúa como puente en el camino más corto entre dos nodos. Mide la capacidad del nodo para modular el flujo de información entre áreas de la red.

En esta tesis doctoral se utilizó el paquete específico de R: “spieeasy” (v. 1.0.2) (Kurtz et al., 2015) para el cálculo de las redes de co-ocurrencia de las comunidades microbianas del suelo. Spiee-Easi (Sparse InverseE Covariance estimation for Ecological Association and Statistical Inference) es capaz de estimar redes de co-ocurrencia a partir de una `otu_table` gracias a un proceso de inferencia.

## MATERIAL Y MÉTODOS

1. *Procesamiento de los datos y transformación CLR*: antes de empezar la creación de la red, los datos son pre-procesados y normalizados; tras lo cual son transformados para asegurar la solidez de su composición mediante la transformación CLR (centered log-ratio).
2. *Selección de vecindario ("Neighborhood selection")*: en este paso se elige entre uno de los dos modelos posibles: el método MB (Meinshausen and Bühlmann, 2006) o el método GLASSO (Friedman et al., 2007).
3. *Modelo de selección basado en estabilidad (Stability Approach to Regularization Selection (StARS))*: consiste en el submuestreo aleatorio del conjunto de datos para encontrar una red con baja variabilidad en el conjunto seleccionado de aristas.

Una vez se calcularon y analizaron las redes de co-ocurrencia, se llevó a cabo el estudio de las especies clave desde un punto de vista topológico (*network keystone*) de la microbiota del suelo. Las especies clave son especies que tienen una gran importancia en la comunidad, manteniendo la estructura y el funcionamiento de los ecosistemas. La estimación de estas *keystone* se realizó mediante la selección de aquellas OTUs que mostraron un alto grado y una alta enmediedad (Martín González et al., 2010; Steele et al., 2011; Faust and Raes, 2012; Banerjee et al., 2016b). Se escogieron estos parámetros debido a que las OTUs con un alto grado son "núcleos" (*hubs*), estando unidas a una alta proporción de especies en la comunidad; mientras que, las OTUs con una alta centralidad BC son "conectores", uniendo módulos de la red que de otra forma estarían poco conectadas. Para poder comparar las diferentes redes y calcular estas *keystone*, normalizamos ambas métricas dentro de cada red. Se utilizaron dos umbrales diferentes en la elección de las *keystone*. Para los *hubs*, se estableció un umbral de 0.8 en el grado de las OTUs; mientras que, en los conectores se establecieron umbrales de BC diferentes para cada tipo de red, variando entre 0.5-0.8.

El análisis de las *keystones* se completó mediante el cálculo de su abundancia relativa a nivel de filo dentro de la comunidad, un *heatmap* de correlaciones y el uso de diagramas de Venn.

## Estadística

### Análisis de varianza (ANOVA)

Los análisis de varianza (ANOVA) que se realizaron para este estudio son ANOVAs de un solo factor. Este tipo de análisis estadístico tiene como hipótesis nula ( $H_0$ ) que los distintos tratamientos utilizados no producen ningún efecto (o que las medias de todas las poblaciones son iguales), y como hipótesis alternativa ( $H_a$ ) que los tratamientos son diferentes entre poblaciones. Además, para poderse comparar distintas poblaciones, éstas deben presentar una distribución normal, con media  $\mu_i$  y varianza  $\sigma^2$ .

El contraste realizado por un ANOVA se basa en la comparación de la variabilidad “entre” y la variabilidad “dentro” de los grupos; rechazándose la hipótesis nula siempre que la variabilidad entre poblaciones sea grande, pero utilizando como patrón de comparación la variabilidad dentro de las poblaciones.

La variabilidad existente entre los grupos mide la discrepancia entre los grupos y la media global, de forma que, si no hay diferencias entre ellos la hipótesis nula es cierta; mientras que, si existen variabilidades grandes entre los grupos, se aceptaría la hipótesis alternativa. Por otro lado, la variabilidad dentro de los grupos mide la variabilidad intrínseca de las observaciones. Para comparar estas diferencias, se utiliza el estadístico F de Fisher-Snedecor.

$$F = \frac{\sigma_1^2}{\sigma_2^2} = \frac{n\sigma_Y^2}{S_j^2}$$

Donde, el numerador es una estimación de la varianza poblacional basada en la variabilidad que hay entre las medias de cada grupo; y el denominador es una estimación de la varianza poblacional basada en la variabilidad existente dentro de cada grupo.

El análisis de varianza (ANOVA) se utiliza en esta tesis doctoral para comparar si existen diferencias significativas entre los diferentes usos de suelo; así como, entre los diferentes estados de salud de la encina y su influencia en las comunidades microbianas del suelo.

### Modelos lineales mixtos

Los modelos lineales mixtos son similares a los modelos lineales de regresión clásicos, pero se fundamentan en que el error no explicado está particionado en un componente común de las muestras, las cuales provienen de la misma unidad de muestreo (misma localización en nuestro caso).

En estos modelos se analiza cómo una variable dependiente es afectada por una serie de parámetros fijos (variables independientes), los cuales son comunes en toda la población, así como unos parámetros aleatorios que son específicos de cada unidad de muestreo. La formulación general de los modelos mixtos es la siguiente:

$$Y = Xb + Zu + e$$

Donde,  $Y$  es la variable dependiente;  $X$  y  $Z$  son las matrices de datos;  $b$  es el vector de los factores fijos;  $u$  es el vector de los factores aleatorios; y  $e$  es el vector de los errores de distribución. Además, la esperanza matemática (valor medio de un fenómeno aleatorio) de  $u$  y  $e$  se asume igual a cero (Bandera-Fernández and Pérez-Pelea, 2018).

La validación de estos modelos se hace mediante el estudio de sus residuos. Para que el modelo mixto sea válido, los residuos han de seguir una distribución normal y tener una distribución homocedástica de la varianza. Cuando varios modelos mixtos se propusieron como válidos para un mismo estudio, se comparó su coeficiente AIC (Akaike Information Criterion), junto con un razonamiento lógico de las variables, para estimar el modelo lineal mixto que más se ajustase a la realidad ecológica.

Los modelos mixtos se utilizaron en esta tesis doctoral para comprobar el efecto del clima, pH, manejo histórico y defoliación en las variables físico-químicas explicadas anteriormente.



## Modelos de ecuaciones estructurales (SEM)

Los modelos de ecuaciones estructurales o, en inglés, *Structural Equation Models* (SEM) son una familia de modelos estadísticos multivariantes. Estos modelos permiten estimar el efecto y las relaciones entre una serie de variables. Una de las ventajas de estos modelos es que son menos restrictivos que los modelos de regresión ya que permiten incluir errores de medida tanto de las variables dependientes como de las variables independientes. Además, estos modelos también se denominan modelos confirmatorios ya que se requiere de un conocimiento previo sobre el tema de estudio que ayude a comprender y explicar la influencia de las variables.

Para realizar los modelos estructurales es necesario cumplir una serie de suposiciones previas:

- Todas las variables utilizadas tienen una distribución normal.
- Todas las variables son independientes.
- Cada parámetro a estimar requiere de tener al menos 5 muestras, siendo preferible 10 o más.

La representación de estos modelos se lleva a cabo mediante el uso de diagramas de flujo, en los que las flechas denotan las variables que están siendo influenciadas por otras variables. Una representación sencilla de este tipo de diagramas de flujo sería:

$$X_1 \rightarrow Y \leftarrow X_2$$

Donde,  $Y$  es la variable que está siendo influenciada por  $X_1$  y  $X_2$ ; la ecuación que describe este diagrama es:  $Y \sim X_1 + X_2$ .

En esta tesis doctoral, se han utilizado modelos lineales mixtos en la realización de los SEM. La bondad de ajuste de estos modelos se realiza con el C-estadístico, siendo correcto el modelo cuando el  $p$ -valor es mayor a 0.05. De la misma forma que en los modelos mixtos, el coeficiente AIC, junto con un razonamiento lógico de las variables, se utilizó para estimar el SEM que más se ajustase a la realidad ecológica.

**CAPÍTULO 1:** Tree mortality exacerbated climate-induced changes in soil stoichiometry and soil nutrient cycling

## Summary

The extent to which the increasingly frequent episodes of drought-induced tree mortality could accelerate changes in soil stoichiometry and the capacity of soils to sequester carbon (C) is still unclear. This issue is particularly relevant, since forested ecosystems serve as important long-term sinks for C and essential nutrients (e.g. nitrogen and phosphorous). To investigate this, we conducted our investigation in 13 sites distributed across the Iberian Peninsula and where the dominant tree species, Mediterranean evergreen Holm oaks (*Quercus ilex* L. subsp. *ballota* [Desf.]), have shown important symptoms of vulnerability (tree defoliation and mortality) to drought during the last decades. The study, hence, cover a peninsular gradient of climate (mean annual temperatures ranging from 10.62 to 16.15 °C and the mean annual precipitation from 326 to 919 mm). At each study site, soil samples were collected under neighbor trees of different health status: healthy, defoliated, and dead Holm oaks. Soil C and nutrient content (nitrogen, N; phosphorous, P; magnesium, Mg<sup>+</sup>), soil functional parameters (heterotrophic respiration (R<sub>H</sub>), and N mineralization), and key microbial soil functional groups (nitrifiers and ectomycorrhiza) were then studied. Our results show that besides potential effects associated with the climatic gradient of the study, Holm oaks' mortality resulted in soil stoichiometric imbalances, triggered by net losses of essential oligonutrients (e.g. Mg<sup>+</sup>), and accumulation of very mobile forms of nitrogen (NO<sub>3</sub><sup>-</sup> - N) and phosphorous (available P). Changes in the abundance of key microbial soil functional groups (nitrifiers and ectomycorrhizal fungi) co-occurred with observed N and P imbalances. Therefore, we conclude that the potential vulnerability of soil C and nutrient cycling to ongoing changes in climate may strongly depend on tree vulnerability to climate change, its effect on soil-plant relationships, and how this may impact ecosystem functioning and resilience to drought.

### Introduction

Studies have shown how climate change induced increases in the frequency and intensity of drought events may have a direct impact on soil biodiversity (Curiel Yuste et al., 2014; Kandeler et al., 2015; Valencia et al., 2018; Moreno-Jiménez et al., 2019) and soil functioning (Curiel Yuste et al., 2007; Chen et al., 2011; Moyano et al., 2012; Ye et al., 2019), ultimately affecting flows of soil C and nutrients (Sardans and Peñuelas, 2005; Larsen et al., 2011; Xu et al., 2016; Curiel Yuste et al., 2017). In the particular case of Mediterranean ecosystems, where soil moisture plays a central role in plant growth and soil activity (Vilà and Sardans, 1999; Sardans and Peñuelas, 2005; Casals et al., 2009), both the duration of drought events (e.g. Ma et al. (2012); Vargas et al. (2018)) and the cycles of drying and rewetting at which soils are submitted (e.g. Barnard et al. (2013); Rodríguez et al. (2019)) have been identified as drivers of change in rates of soil biodiversity and soil functioning.

However, studies and models have generally avoided assessing the importance of other indirect effects of drought, such as drought-induced tree mortality, which is a potential driver of changes of soil ecology, soil carbon (C) sequestration and nutrient dynamics (Curiel Yuste et al., 2019). Increases in tree mortality is an observed global phenomenon linked to the more frequent and intense drought events (IPCC, 2014; Mariotti et al., 2015), in some cases coinciding with pathogen outbreaks (Edburg et al., 2012; Corcobado et al., 2014), but the extent at which events of tree mortality is affecting ecosystem functioning are still unknown (Anderegg et al., 2012; McDowell et al., 2018). Particularly important are the potential effects of tree mortality on soil ecology and functioning and its potential consequences on soil nutrient cycling (Curiel Yuste et al., 2012; Barba et al., 2013; Barba et al., 2016a; Barba et al., 2016b; Rodríguez et al., 2017; Curiel Yuste et al., 2019; Rodríguez et al., 2019). In this regard, drought-induced tree mortality events have been associated with cascades of causal-effect processes ultimately altering soil ecology and nutrient cycling (Flores-Rentería et al. (2016); Flores-Rentería et al. (2018); Curiel Yuste et al. (2019)). For instance, a loss of tree canopy leads to decreases in transpiration and canopy interception of precipitation and solar radiation, which alters the microenvironmental conditions to which soils are exposed (Anderegg et al., 2012) affecting soil microbial taxonomic composition and its nutrient cycling related functions (Sardans and Peñuelas, 2005; Sardans et al., 2006; Curiel Yuste et al., 2007; Curiel Yuste et al., 2017). Furthermore, modification of the carbon flow to belowground as a result of the interruption of

exudation (Högberg et al., 2001) and/or the increased input of litterfall and dead wood (Curiel Yuste et al., 2019) may also alter nutrient and carbon cycling (Avila et al., 2016; Rodríguez et al., 2017; Flores-Rentería et al., 2018) and soil microbial composition (Curiel Yuste et al., 2012; Lloret et al., 2015).

Studies have further shown how N cycling might be particularly sensitive to climate change-induced increase in drought events and associated tree defoliation events (Chen et al., 2011; Griffin et al., 2011; Lupon et al., 2015; Xu et al., 2016; Curiel Yuste et al., 2019). In particular, Rodríguez et al. (2017), observed an increased in soil N mineralization which could be associated with a growth stimulation of bacteria that might mineralized N sources. Hence, an increase in N mineralization due to tree mortality could reduce the availability of inorganic N in soils because of the fast consumption of  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  and the accumulation of more mobiles forms of N (e.g.  $\text{NH}_3^-\text{-N}$ ) (Rodríguez et al., 2017; Avila et al., 2019; Rodríguez et al., 2019). However, to our knowledge, no studies have explored how drought-induced tree defoliation and death could affect these N cycling-related functional groups.

In this study, we investigated the potential effects of tree mortality on soil ecology and soil nutrients cycling at a regional scale (Iberian Peninsula). With this study we want to demonstrate that tree mortality can be an agent of change that accelerates or exacerbates the effects of climate on soil ecology and soil nutrient cycling. In this regard, we used forest and open woodlands dominated by Holm oaks (*Quercus ilex* subsp. *ballota*) as our study system. Though this species is native to the Mediterranean basin, last decades have witnessed increasingly frequent episodes of defoliation and mortality events throughout its entire range of distribution (Lloret et al., 2004; de Sampaio e Paiva Camilo-Alves et al., 2013; Hereş et al., 2018). Because the distribution range of this species is broad in the Iberian Peninsula and experiences a large climatic gradient and large spectra of land-uses, we selected study sites representing a climatic gradient and different land-uses (from grazed woodlands to forests). Sites were also selected where Holm oak trees have shown signs of vulnerability (i.e., defoliation and mortality) during the last decades. At each of these locations, we studied soil variables related to the cycling of C, N and P and dynamics of plant-growth related oligonutrient content (e.g. Magnesium or Potassium). Based on previous studies, we hypothesize that: i) the impact of Holm oak mortality on soil ecology and soil nutrient dynamics may obscure or even exacerbate those effects from climate; ii) holm oak mortality could alters soil concentration of N mineral forms because tree mortality may affect

## CAPÍTULO 1

soil microbial functional groups responsible for the consumption and generation of N mineral forms.

### Materials and methods

#### Study areas

We considered 13 Holm oak (*Quercus ilex* L. subsp. *ballota* [Desf.]) sites distributed across the Iberian Peninsula and covering the entire range of this species (Table 1, Figure 7). We chose the study sites in areas where Holm oak trees have been showing symptoms of decline (e.g., defoliation) and drought-induced mortality rates in recent decades according to data obtained from different forest inventories and literature on Holm oak (ICP Forest, <http://icp-forests.net/>), (MAGRAMA, 2007), (Lloret et al., 2004; Corcobado et al., 2013a; Camarero et al., 2014; Camarero et al., 2015). The climate of the study sites varies from oceanic to semiarid, being in most cases continental Mediterranean. The mean annual temperature (MAT) varies from 10.62 to 16.15 °C and the mean annual precipitation (MAP) from 326 to 919 mm (Felicísimo et al., 2011) (Table 1). We categorized the study sites using measurements of crown coverage (% of tree per ha) as a proxy of land-use (MAGRAMA, 2007). Categories included: four forests (hereinafter referred to as FR), four dehesas (hereinafter referred to as DH), and another land-use that we called open woodlands (hereinafter referred to as OW) (five different OW), characterized by having a crown coverage per ha between dehesas and forests, which generally refer to abandoned DH that are not used anymore for livestock.

#### Experimental design and soil sampling

We used a factorial experimental design in order to test how soil ecology, soil function and biogeochemical cycles may be affected by Holm oak defoliation and mortality, considering a regional-scale climatic gradient (Precipitation from 326 to 919 °C) and taking into account the natural variability of pH and land-uses inherent to the regional scale of the study. For an in deep explanation about the experimental design (e.g. selected trees, tree health categories...) and soil sampling, please review the pages 34 - 38 from “Material y métodos”.

## **Main site characterization**

We measured the height, canopy diameter, diameter at breast height (dbh) and vegetation area index (VAI) for each of the 351 selected Holm oaks. Besides, we visually analyzed the amount (%) of non-herbaceous (shrubs and seedling), herbaceous and bare soil content (non-vegetation cover), as well as the number of trees with dbh > 15 cm DBH (adult trees) and dbh < 15 cm DBH (young trees) in a 5-meter radio around the trunk of each of the 351 Holm oaks. To maintain the consistency of the data, we estimated these parameters by consensus among four different observers.

## **Soil biogeochemical variables and soil microbial biomass**

The analysis followed for the estimation of soil biogeochemical variables and soil microbial biomass is explained on pages 38 - 42 of the general material and methods. As a brief summary, we calculated the soil variables related to pH, Soil Organic Carbon (SOC), cation concentration ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{+}$ ,  $\text{K}^{+}$ ,  $\text{Na}^{+}$ ), ammonium ( $\text{NH}_4^{+}$  - N), nitrate ( $\text{NO}_3^{-}$  - N), soil heterotrophic respiration ( $R_H$ ), net ammonification ( $R_{\text{amm}}$ ), net nitrification ( $R_{\text{nit}}$ ) and soil microbial biomass using the method Substrate-Induced respiration.

## **DNA extraction, 16S and ITS amplicon sequencing and bioinformatic analysis of sequencing data**

The extraction, sequencing and bioinformatic analysis of the 16S and ITS amplicons can be found on pages 43 - 51. As a summary, we extracted soil DNA using the PowerSoil DNA Isolation Kit (MoBio, CA, USA) and sent the resultant samples to the Research Technology Support Facility at Michigan State University to carry out the construction of the amplicon libraries. We amplified the V4-V5 regions of the 16S rRNA gene using A515F and Y/926R primers described by (Parada et al., 2016), and for fungi, we targeted the ITS1 region using ITS1FI2 and ITS2 primers (Schmidt et al., 2013). The bioinformatic analysis was made using Qiime 1.9.1 (Caporaso et al., 2010) and the RPD database and UNITE database for bacteria and fungi, respectively, as reference (Cole et al., 2014). The subsequent analysis were carried out in R v. 3.5.1 (R Core Team, 2016) using the packages phyloseq v. 1.24.2 (McMurdie and Holmes, 2013) and vegan v. 2.5-4 (Oksanen et al., 2019).

### **Statistical analyses**

We carried out all statistical analyses in R v. 3.5.1 (R Core Team, 2016). We tested tree-related variables according to their land-use (FR, DH, OW) by performing one-way ANOVAs. We evaluated the effects of climate, pH, land-use and defoliation degree (healthy, affected, and dead Holm oaks), as well as their interactions on soil using Linear Mixed-Effects models (LME) (Pinheiro et al., 2017) with livestock grazing nested to locations as random effect. Livestock grazing was calculated as a boolean variable (presence/absence) of the livestock in that location. We chose this random parameter due to the different non-measured variables at which each study site was exposed; taking into account the importance of the livestock grazing which may occur in some of our plots (e.g., DH). To prevent duplicity of data in the models, we first examined the co-variance and multicollinearity between fixed factors using the Variance Inflation Factor (VIF), using in our models the explanatory variables with VIF values lower than 2 (Zuur et al., 2010). We performed linear mixed-effect models among all possible models (including random slopes models); if more than one presented a significant effect, the AIC coefficient was used to select the best model. Furthermore, we conducted another LME analysis with climate, pH and land-use as fixed variables and livestock grazing nested to locations as random effect. Once we removed the effect of these abiotic variables, we used the residuals to perform a Principal Component Analysis (PCA) with soil variables and tree defoliation.

After that, we carried out a structural equation model (SEM) with the function “psem” from the piecewiseSEM package (Lefcheck, 2016) which allowed the use the random effect as in LME. We constructed a SEM model based on the relations observed with the LME function: we used climate (MAP and MAT), pH and defoliation degree (healthy, affected, and dead Holm oaks) as external explicative variables. Moreover, for this analysis, we included all measured variables, e.g. pools (SOC, total N, etc.), and soil functional groups (ectomycorrhiza, Nitro-prokaryote). To test the goodness of fit of our SEM, we calculated the Fisher’s C statistic, as well as the AIC coefficient to complete and improve the model following the author’s indications (Lefcheck, 2016).



## Results

### Aboveground vegetation structure associated with land-use and tree defoliation

The structure of the aboveground vegetation around Holm oaks varied across the different land-use intensities (FR, DH, and OW) and levels of tree defoliation (healthy, affected, and dead trees) (Tables 3 & 4). As expected, DH had higher herbaceous cover than FR and OW. OW had shorter trees, and DH had trees with larger canopies and dbh (Table 3). Vegetation area index (VAI) and the total number of trees around the selected Holm oaks were significantly lower in highly managed stands (DH) compared to FR and OW. Moreover, DH and OW did not show signs of recovery after the tree mortality event, as indicated by the chronic decrease in VAI, lack of regeneration (no observed increase in non-herbaceous cover), and even increases in soil surface non-covered by vegetation (bare soil) in the case of the most intensively managed DH ecosystems (Table 4).

**Table 3.** One-way ANOVA results of tree-related variables and aboveground vegetation in a 5-meter radio from the selected Holm oaks (see Materials and methods). Different letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between land-uses. Values in parenthesis represent standard errors.

Variable	DH	OW	FR	ANOVA		
				F	df	P
Height (m)	5.77 (0.19) A	4.34 (0.11) B	5.61 (0.16) A	29.69	2	< 0.001
Canopy (m)	29.71 (2.02) B	10.9 (0.78) A	12.8 (0.89) A	62.96	2	< 0.001
dbh (cm)	24.02 (0.73) B	16.85 (0.51) A	18.34 (0.55) A	40.32	2	< 0.001
Non-herbaceous (%)	32.80 (4.37) A	39.39 (4.16) A	33.70 (2.08) A	0.945	2	0.39
Herbaceous (%)	33.81 (3.23) B	17.47 (2.03) A	21.50 (2.85) A	10.13	2	< 0.001
Bare soil (%)	33.78 (2.49) A	43.14 (4.83) A	44.81 (3.35) A	2.344	2	0.10
Total trees	5.86 (1.48) B	14.84 (1.70) A	12.06 (1.05) A	9.54	2	< 0.001
VAI	0.80 (0.03) C	1.24 (0.05) B	1.34 (0.07) A	23.82	2	< 0.001

Where FR, forests; DH, dehesas; OW, open woodlands; VAI, vegetation area index

## CAPÍTULO 1

**Table 4.** One-way ANOVA results of the aboveground vegetation in a 5-meter radio from the selected Holm oaks (see Materials and methods) considering all tree health groups per land-use. The results are grouped considering the % of non-herbaceous vegetation (shrubs and seedlings), herbaceous vegetation, and bare soil, and also the total number of trees (adult and young trees), and the Vegetation Area Index (VAI). Different letters represent significant differences between tree health groups ( $P < 0.05$ ). Values in parenthesis represent standard errors.

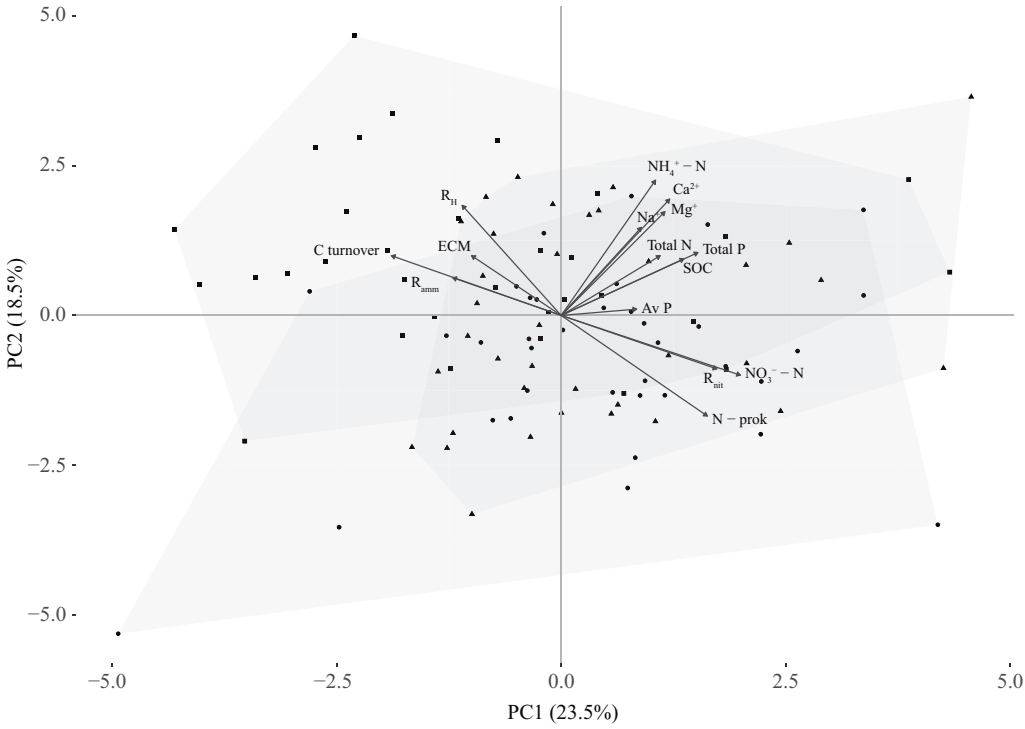
Land-use	Non-herbaceous (%)	Herbaceous (%)	Bare soil (%)	Total trees	VAI
Tree Health					
Dehesa					
Healthy	26.11 (6.05) A	31.36 (5.23) A	42.53 (4.54) A	4.33 (1.41) A	0.94 (0.03) A
Affected	33.97 (7.95) A	37.28 (6.38) A	28.75 (3.30) B	6.86 (3.32) A	0.81 (0.05) AB
Dead	38.33 (8.69) A	32.81 (5.46) A	28.86 (4.05) B	6.39 (2.73) A	0.67 (0.06) B
Open Woodland					
Healthy	40.18 (7.43) A	14.47 (2.45) A	45.36 (8.42) A	13.07 (2.34) A	1.37 (0.08) A
Affected	38.22 (7.18) A	20.07 (4.25) A	41.71 (8.70) A	13.67 (2.25) A	1.07 (0.06) B
Dead	39.76 (7.49) A	17.89 (3.67) A	42.36 (8.55) A	17.78 (3.97) A	0.94 (0.06) B
Forest					
Healthy	25.78 (3.01) A	21.72 (5.25) A	52.50 (6.10) A	10.22 (1.86) A	1.42 (0.09) A
Affected	33.28 (3.67) AB	23.39 (5.37) A	43.33 (6.43) A	12.31 (1.67) A	1.37 (0.13) A
Dead	42.03 (2.60) B	19.39 (4.54) A	38.58 (4.39) A	13.66 (1.94) A	1.21 (0.15) A

### Soil stoichiometry and soil functioning in a gradient of land-use, abiotic variables and tree defoliation

According to the Linear Mixed-Effects models (LME) results, the abiotic factors (i.e., climate, pH) and tree defoliation (i.e., healthy, affected, and dead) were the main explanatory variables that showed additive and interactive effects on soil stoichiometry and functioning. On the other hand, no significant differences were found between the different historical land-uses considered for this study (FR, DH, and OW). Additionally, only total N showed a negative relation with land-use, presenting more N land-uses with lower crown coverage (Tables 5 & 6). The climatic effect was mainly related to the limiting effects of MAP, rather than MAT (Figure 11). Specifically, MAP affected positively SOC and its decomposition and associated N mineralization ( $R_H$  and  $R_{amm}$  (Figure 11)), and negatively the pools of mineral N and nitrifiers (Tables 5 & 6). On the other hand, soil pH affected the capacity of soils to oxidize ammonium by controlling the amount of soil available  $NH_4^+ - N$  (i.e. a decrease in pH resulted in the liberation of  $NH_4^+ - N$ , see Figure 11) further affecting net nitrification rates ( $R_{nit}$ ). Furthermore, soil pH was positively correlated with soil microbial biomass, which ultimately resulted in large increases in  $R_H$  (Table 6).

Nevertheless, tree defoliation was the factor that correlated more strongly with both the soil stoichiometry and the soil functional variables (Tables 5 & 6; Figures 10, and 11). The accumulation of SOC was positively affected by MAP and tree defoliation. Moreover, tree defoliation and subsequent death was related to soil C turnover ( $R_H$  per unit of SOC), resulting in a net decrease in rates of mineralization of C and N (less  $R_H$  and  $R_{amm}$ ), being all these 3 variables more associated with healthy trees (Figures 10 & 11). Defoliation was also strongly associated with the accumulation of Av and total P but also with net losses of essential ions such as  $Mg^{2+}$  and  $Na^+$  in soils (Table 5). Overall, we observed an especially strong influence of tree defoliation over population, pools and metabolic paths involved the N cycle (Table 6, Figure 11). Tree defoliation was associated with large changes in the ectomycorrhizal and Nitro-prokaryote communities and consequently in an increase in net nitrification (Figure 11) and the accumulation of the ion nitrate ( $NO_3^- - N$ ) under dead trees in detriment of the ion ammonium ( $NH_4^+ - N$ ) (Table 5). This transformation in soil biogeochemical cycling lead to accumulation of mobile forms of nitrogen ( $NO_3^- - N$ ) and phosphorous (available P) that could be related to an increase in the relative abundance of Nitro-prokaryotes and a decrease in ectomycorrhizal fungi in our defoliation gradient (Table 6; Figures 10 & 11). Moreover, our results show also how Nitro-prokaryotes play an important role in nitrogen transformation, decreasing the concentration of ammonium and increasing net nitrification (Figure 11).

# CAPÍTULO 1



**Figure 10.** Principal Component Analysis of soil biodiversity and cycling among tree defoliation. Squares represent healthy Holm oaks, triangles represent affected Holm oaks and circles represent dead Holm oaks. Where, SOC = soil organic carbon;  $\text{NH}_4^+ - \text{N}$  = soil ammonium content;  $\text{NO}_3^- - \text{N}$  = soil nitrate content; Av P = available phosphorus; N-prok = Nitro-prokaryote; ECM = ectomycorrhizal fungi;  $R_{\text{amm}}$  = net ammonification;  $R_{\text{nit}}$  = net nitrification; and  $R_{\text{H}}$  = heterotrophic respiration.

**Table 5.** Results of Linear Mixed-Effects models of soil nutrient pools in an abiotic, land-use and defoliation gradient; bold P-values indicate significant effects.

Response variables	Estimate	SE	df	t-value	P-value
<b>SOC *</b>					
MAP	0.001	<0.001	101	1.978	0.05
Defol	0.004	0.002	101	2.089	0.04
MAP x Defol	-0.001	<0.001	101	-1.704	0.09
<b>Total N *</b>					
land-use	-0.011	0.003	11	-3.119	0.01
Defol	<0.001	<0.001	103	1.483	0.14
<b>Total P *</b>					
MAT	0.244	0.093	10	2.631	0.025
land-use	-0.009	0.005	10	-1.683	0.123
Defol	0.001	<0.001	94	2.809	0.006
<b>NH<sub>4</sub><sup>+</sup> - N</b>					
MAT	-86.006	39.269	11	-2.190	0.05
MAP	-1.472	0.667	96	-2.206	0.03
Defol	-6.712	3.434	96	-1.957	0.05
MAT x MAP	0.128	0.05	96	2.511	0.01
MAT x Defol	0.517	0.262	96	1.975	0.05
MAP x Defol	0.01	0.005	96	2.181	0.03
MAT x MAP x Defol	-0.001	<0.001	96	-2.224	0.03
<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup> - N *</b>					
MAT	0.098	0.117	11	0.840	0.42
MAP	-0.002	0.001	102	-1.571	0.12
Defol	0.005	0.001	102	3.790	<0.001
<b>AvP</b>					
Defol	<0.001	<0.001	101	2.387	0.02
<b>Ca<sup>2+</sup> *</b>					
pH	0.467	0.043	100	10.951	<0.001
<b>Na<sup>+</sup></b>					
Defol	-0.001	<0.001	102	-1.983	0.05
<b>Mg<sup>+</sup></b>					
Defol	-0.014	0.005	103	-2.832	0.0056

\* Variables log transformed: SOC = soil organic carbon; ; NH<sub>4</sub><sup>+</sup> - N = soil ammonium content; NO<sub>3</sub><sup>-</sup> - N = soil nitrate content; Av P = available phosphorus; Ca<sup>2+</sup> = calcium; Na<sup>+</sup> = sodium; Mg<sup>+</sup> = magnesium

where, SE = standard error; df = degrees of freedom; MAT = mean annual temperature; MAP = mean annual precipitation; land-use = land-use intensity (FR, DH and OW); Defol = crown defoliation

## CAPÍTULO 1

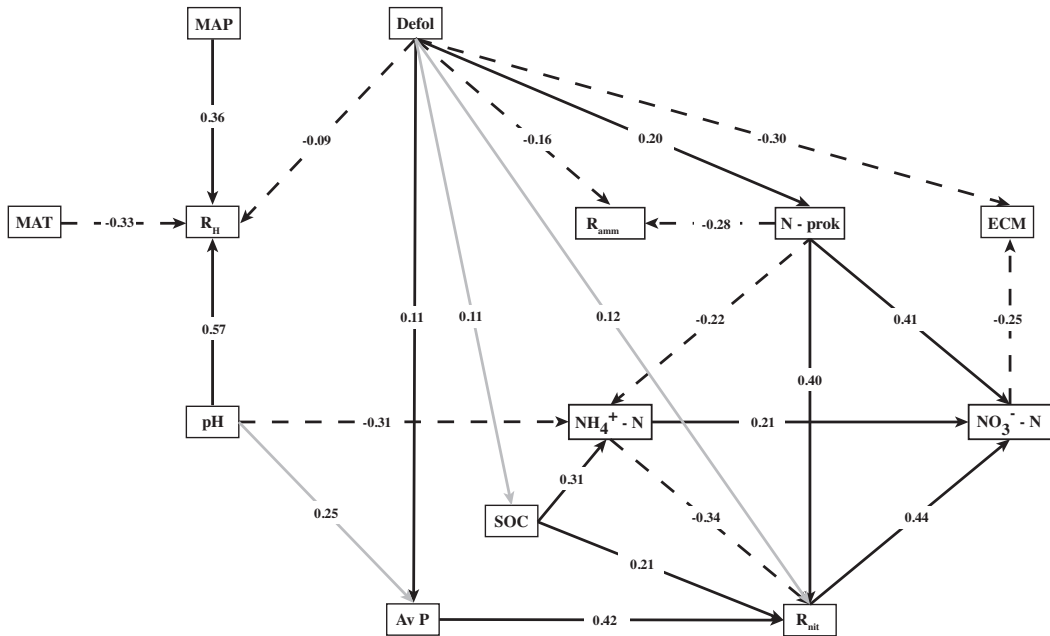
**Table 6.** Results of linear mixed models of soil microbiota and soil microbial functioning in an abiotic, land-use and defoliation gradient; bold P values represent a significant effect.

Response variables	Estimate	SE	df	t-value	P-value
<b>Microbial biomass *</b>					
pH	0.263	0.057	103	4.61	<0.001
<b>N-prok **</b>					
MAP	-0.001	0.000	94	-2.160	0.03
Defol	0.001	0.001	94	3.752	<0.001
<b>ECM **</b>					
Defol	-0.013	0.003	99	-4.280	<0.001
<b>R<sub>amm</sub></b>					
MAP	0.027	0.012	100	2.312	0.02
Defol	-0.041	0.011	100	-3.615	<0.001
<b>R<sub>nit</sub> *</b>					
pH	0.264	0.127	97	2.081	0.04
Defol	0.005	0.001	97	3.246	0.002
<b>R<sub>H</sub> *</b>					
pH	0.537	0.068	101	7.900	<0.001
Defol	-0.001	<0.001	101	-2.012	0.05
<b>C turnover *</b>					
pH	0.510	0.073	99	7.01	<0.001
Defol	-0.001	0.000	99	-2.368	0.02

\* Variable log transform: Microbial biomass; R<sub>nit</sub>: net nitrification; R<sub>H</sub>: soil heterotrophic respiration; C turnover: R<sub>H</sub> per unit of organic C.

\*\* Variable square root transform: N-prok: Nitro-prokaryote; ECM: Ectomycorrhizal fungi.

where, SE = standard error; df = degrees of freedom; R<sub>amm</sub>: net ammonification; MAP = mean annual precipitation; Defol = crown defoliation.



**Figure 11.** Structural equation model (SEM) representation. Path diagram representing hypothesized causal relationship between climate (mean annual precipitation = MAP, mean annual temperature = MAT), pH, tree defoliation (Defol), and soil biodiversity and cycling. Arrows depict causal relationships: positive and negative effects are indicated by solid and dashed lines respectively, with numbers indicating the standardized estimated regressions weights (SRW). Black arrows represent significant relationships, while grey arrows represent marginally significant relationships. Where, SOC = soil organic carbon;  $\text{NH}_4^+ - \text{N}$  = soil ammonium content;  $\text{NO}_3^- - \text{N}$  = soil nitrate content; Av P = available phosphorus; N-prok = Nitroprokaryote; ECM = ectomycorrhizal fungi;  $R_{\text{amm}}$  = net ammonification;  $R_{\text{nit}}$  = net nitrification; and  $R_{\text{H}}$  = heterotrophic respiration.

## Discussion

Our study provides solid evidences on tree mortality alterations of soil biogeochemical cycling, which in many cases obscured direct effects of climatic variability as that covered by this study in the peninsular climatic gradient of this study. We found that Holm oak defoliation and death exacerbated the potential and well documented effects of climate (Sardans and Peñuelas, 2013; Curiel Yuste et al., 2014; Gómez-Aparicio et al., 2017; Bastida et al., 2019; Curiel Yuste et al., 2019) over soil ecology and nutrient cycling. Our results show how in the aridity gradient of this study, precipitation (MAP) played a relevant role by limiting the accumulation of soil C, as well as key soil functions involved in the cycling of N and C, such as the net N

## CAPÍTULO 1

ammonification and  $R_H$ , respectively. Since most of microbial life forms in soils are aquatic (Pietramellara et al., 2002), the absence of water limits the capacity of soil microbiota to decompose SOM, hence altering  $R_H$  (Curiel Yuste et al., 2003; Curiel Yuste et al., 2007; Moyano et al., 2012; Sardans and Peñuelas, 2013; Jiao et al., 2016; Jeong et al., 2018) as well as other functions related to N mineralization (Chen et al., 2011; Larsen et al., 2011; Xu et al., 2016).

On the other hand, our results show how the process of tree defoliation and subsequent tree death triggered a cascade of causal-effect processes ultimately affecting most soil biogeochemical cycles, which outweighed, in many cases, the direct effect of climate. Our results, therefore, show tree mortality as one of the main factors that should be taken into account in order to understand how ongoing changes in local climate could potentially affect soil biogeochemical cycling and the capacity of soils to function (Curiel Yuste et al., 2019). For instance, tree defoliation was, together with precipitation (MAP), the only variable that explained most of the observed changes in SOC sequestration. Accumulation of senescent leaves and fine roots (Curiel Yuste et al., 2019) together with the observed decrease in C turnover rates ( $R_H$  on a carbon basis) following the reduction in labile C inputs that stimulate  $R_H$  (e.g. root exudates; see Kuzyakov (2002); Blagodatskaya and Kuzyakov (2008)) could explain this increase in SOC associated with tree defoliation. Tree defoliation was also related to stoichiometric imbalances, resulting from losses in essential oligonutrients and the transformation of other nutrients into mobile forms ( $\text{NO}_3^-$ -N and  $\text{A}_\text{v}\text{P}$ ) that are accumulated in soil and not taken up by plants. Indeed, these stoichiometric imbalances could hinder the recovery (e.g., regeneration of vegetation) of these highly human-transformed ecosystems because  $\text{Mg}^{2+}$  is an essential constituent of the rubisco enzyme. Hence, the micronutrients losses expected under more arid conditions (Moreno-Jiménez et al., 2019) could be accelerated by the subsequent transformations and imbalances of soil stoichiometry from tree mortality, thereby hastening the conversion of these woodlands to savanna-type ecosystems (Fensham et al., 2009; Anderegg et al., 2012). Particularly, the observed lack of recruitment (% of non-herbaceous vegetation) and the decrease in plant canopy (VAI) after tree mortality observed under more intensively managed sites (OW and DH) suggest that the capacity of these ecosystems to recover after tree mortality events could be compromised, leading to a gradual transformation of these ecosystems into shrublands or grasslands (Fensham et al., 2009; Anderegg et al., 2012) further affecting the C and nutrient source/sink dynamics (Adams et al., 2010; Hicke et al., 2012).



Tree mortality effects were especially intense for metabolic paths involving soil N cycling, obscuring in many cases the well-known sensitivity to drought of key pathways such as nitrification (Chen et al., 2011). This is consistent with previous results showing how severely the N cycle could be affected by the loss of tree health and its subsequent mortality (Jenkins et al., 1999; Griffin et al., 2011; Xiong et al., 2011; Edburg et al., 2012; Avila et al., 2016; Rodríguez et al., 2017). The Structural equation model (SEM) showed imbalances in the production/consumption of mineral forms of N (ion ammonia and nitrate) mediated to a large extent by the change in the relative abundance of key microbial functional groups involved in N cycling. Tree mortality resulted in accumulation of mobile forms of N ( $\text{NO}_3^-$  - N) due to the stimulation of metabolic pathways leading to transformation of  $\text{NH}_4^+$  - N into  $\text{NO}_3^-$  - N. This increased in soil N was positively associated with the observed proliferation of Nitro-prokaryotes (composed by ammonia-oxidizers archaea and bacteria) and the decrease in N demand by plants, observed on the subsequent decrease in the ectomycorrhizal fungi (ECM), which are responsible for the uptake of N from soil to plants (Koide et al., 2014). While this observed increase in the production of  $\text{NO}_3^-$  - N by the soil microbiota following tree mortality has not been identified before, it was, according to our SEM, further facilitated by the parallel increase in available P, which generally becomes a limiting nutrient under no limitation of N (He and Dijkstra, 2015; Deng et al., 2017). Accumulation of mobile forms of N ( $\text{NO}_3^-$  - N) associated with tree mortality may stimulate denitrification leading to emissions of N oxides (e.g.  $\text{N}_2\text{O}$ ) to the atmosphere (Li et al., 2016). Nitrate accumulation, together with mobile forms of P ( $\text{A}_\text{v}\text{P}$ ), might also lead to losses of N and P through leaching to aquifers or other water sources, which could potentially alter water quality (e.g., eutrophication) as well as deteriorate soils, accelerating the process of conversion into shrublands or grasslands (Stark and Richards, 2008). Hence, understanding the mechanisms that relates tree mortality with key metabolic pathways involving nutrient cycling might be needed to fully understand how climate change may affect soils functioning and soil C and nutrient cycling.

### Conclusions

We observed that the effect of tree defoliation over soil ecology, functioning and stoichiometry was stronger than the climatic gradient of this study. Numerous studies have shown the effects of climate on soil ecology and soil nutrient cycling. Nevertheless, this study shows that the direct alterations resulting from the changes in climate in this aridity gradient can be, in many cases, obscured and/or exacerbated by the effect of tree defoliation and mortality. Tree defoliation triggers a cascade of causal-effects relations leading to important changes in the relative abundance of key soil microbial functional groups such as nitrifiers and ectomycorrhizal fungi and resulting in important transformations of some of the metabolic pathways controlling N and P cycling. Negative consequences of the subsequent accumulation of mobile forms of N ( $\text{NO}_3^-$  - N) or P ( $\text{A}_v\text{P}$ ) associated with tree mortality might be multiple; stimulate denitrification leading to emissions of N oxides (e.g.  $\text{N}_2\text{O}$ ) to the atmosphere, leaching of these mobile forms of N and P to aquifers or other water sources, which could potentially alter water quality (e.g., eutrophication) as well as deteriorate soils, accelerating the process of conversion into shrublands or grasslands. We therefore conclude that an in-depth understanding of how tree mortality induced alterations of the plant-soil relationships are needed in order to entirely understand climate-change effects on ecosystem and soil functioning.

## **CAPÍTULO 2:** Land-use intensity modulate the sensitivity and recovery of soil core microbial communities in Mediterranean Holm oaks

## Summary

Land-use is, together with climate change, a major driver of habitat degradation, affecting woodland ecosystems worldwide. Effects may be direct, such as soil disturbance or fragmentation, or indirect, through changes in soil biodiversity and the functions performed by the soil microbiota. However, in depth regional studies exploring how the intensity of land-use may alter soil microbiota and its vulnerability to environmental perturbations are still missing, hindering our ability to understand the relationships between above and below ground communities. Here, we investigated the structure of the co-occurrence networks of soil microbiota under holm oaks (*Quercus ilex* subsp. *ballota*) along a gradient of land-use intensity ranging from heavily managed dehesas to relatively intact forests. Our study covers the whole area of distribution of holm oaks in the Iberian Peninsula, and include gradients in climate, pH and tree health. We used a filter-step criteria based on abundance and presence to define and study the structure and composition the core community of soil bacteria and fungi, which represent the most abundant taxa from each soil microbial community. Our results show a strong effect of land-use intensity over the composition and diversity of the core soil microbiota, resulting in a higher proportion of climate-sensitive microorganisms towards the most managed end of our land-use intensity gradient. Keystone taxa, identified through co-occurrence networks, showed similar responses to environmental and soil variables as the rest of the core community. The transformation of dehesas into open woodlands due to a natural process of ecosystem restoration seemed to alleviate the effect of land-use in soil microbiota, returning the structure and composition of the soil core community to levels similar to unperturbed forests.

### Introduction

Anthropogenic activities on natural systems are, together with climate change, major drivers of the ongoing global change. These factors exert effects on the health and functioning of woodland ecosystems worldwide (Allen et al., 2010; Smith et al., 2016), affecting directly above-ground diversity by removing (e.g. deforestation) or replacing tree species with more profitable or adaptive species (Hereş et al., 2012). Furthermore, these factors also have indirect effects through the belowground microbiota associated to tree species, which has been further linked to changes in soil stoichiometry and nutrient storage (Barba et al., 2013; Gazol et al., 2018a). These changes are, in turn, also known to affect aboveground plant growth and resilience to climate change (Barba *et al.*, 2013, Gazol *et al.*, 2018, Garcia-Angulo et al. *submitted*), resulting in a feedback between the below and above ground communities. Several studies show that the transformation of forest into croplands or pastures results in shifts in the abundance and diversity of soil microbial communities (de Carvalho et al., 2016; Petersen et al., 2019), which may decrease soil organic carbon (SOC) and soil nitrogen (N) (Murty et al., 2002; Wei et al., 2014). Other anthropogenic activities, such as thinning (removal of selective trees to increase nutrients, water and light availability) or tillage (mechanical manipulation of the soil to increase crop production), also have the capacity to alter soil microbial communities and nutrients (Anderson et al., 2017; Wu et al., 2019). Furthermore, climate change may modify the structure and composition of aboveground vegetation by affecting tree health directly (e.g. tree dieback) (Allen et al., 2010; Carnicer et al., 2011; Anderegg et al., 2012), triggering a cascade of causal-effects that can end up also affecting soil microbiota and biogeochemistry (Rodríguez et al., 2017; Curiel Yuste et al., 2019). Likewise, changes in land-use intensity and anthropogenic activities have the capacity to, at least in some cases, mitigate the effects of climate change (Flores-Rentería et al. 2015). Thus, an understanding of the link between land-use intensity, belowground diversity and plant resistance to climate change is of foremost importance and can open unexplored venues for the amelioration and restoration of global change perturbations on natural ecosystems worldwide.

Understanding these dynamics is a pressing matter given current projections on climate change (IPCC, 2014), biodiversity loss and the increasing pressure by anthropogenic activities (IPBES, 2019). This is particularly relevant for areas that are both heavily managed and suffer strong effects of ongoing climate change. One of such

cases is the Mediterranean basin. Human presence and intensive land management along the Mediterranean spans thousands of years. This ecosystem is nowadays facing longer periods of warmer temperatures and lack of precipitation, hindering the correct functioning of soil microbiota (Sardans and Peñuelas, 2005). For instance, the development of activities such as agriculture, grazing, logging, and hunting in the Iberian Peninsula has been, and still is, highly widespread (Joffre et al., 1999; Guzmán Álvarez, 2016). Intensively managed grasslands with a very sparse canopy of evergreen oaks, are iconic agroecosystems called “dehesas” in Spain and “montados” in Portugal. Dehesas have a strong historical socioeconomic component, as they support livestock, agricultural production and forestry (Campos-Palacín, 1986; Joffre et al., 1999; Linares, 2007). However, many of these dehesas have been recently abandoned because of migrations of human populations towards urban areas, resulting in two contrasting scenarios: on one side, if the dehesa is not degraded and the soil maintains its proper characteristics, regeneration is highly possible, leading to open woodlands ecosystems (Pulido et al., 2013); on the other side, if the nutritional condition of the soil is deficient and/or the climatic conditions are adverse (e.g. increasing temperatures, drought episodes...), the regeneration of tree communities is not possible, resulting in grasslands (Corcobado et al., 2013b).

The aim of this study was to assess how soil microbiota (bacteria and fungi) differed along a gradient in land-use intensity, ranging from heavily managed dehesas, open woodlands (abandoned dehesas), to intact forests. We used a battery of complementary analysis to study the composition and structure of the core soil microbiota community and their sensitivity to abiotic variability (climate and pH) in a regional gradient and their relation to soil nutrient cycling (Carbon, Nitrogen and Phosphorus). We used co-occurrence networks to obtain an overview of the response of the core soil microbial community to land-use changes and environmental variables (Fuhrman, 2009; Ramirez et al., 2018), and to identify key taxa whose removal may cause drastic shifts in the structure and/or functioning of the community (Martín González et al., 2010; Fisher and Mehta, 2014; Herren and McMahon, 2018). Based on previous bibliography, we hypothesize that i) the structure and composition of the microbial core community (and the identity of the keystone taxa) will differ along land-use categories, ii) that the abandonment of the dehesas will revert soil microbial communities to previous stages (intact forests).

### Material and methods

#### Study area

We selected 13 locations across the Iberian Peninsula covering the large distribution range of *Quercus ilex* subs *ballota*, representing all different land-use intensities at which holm oaks are subject to in the Mediterranean basin. In this regard, the Iberian Peninsula is a great laboratory, because all the spectra of land-use intensities are well represented, from protected forests with little or no management, to highly managed dehesas, used intensively for livestock grazing. And, in between, woodland formations (open woodlands) that generally result from the abandonment of anthropogenic activities in the dehesas. We categorized our sampling locations based on these three types of land-use intensities according to *Q. ilex* crown coverage. The climate of our sampling locations had a predominance of continental Mediterranean, characterized by rainfalls concentrated in spring and autumn, and summers with high temperatures and water scarcity. Mean annual temperatures (MAT) and mean annual precipitation (MAP) ranged from 10.62 - 16.15 °C and 326 - 919 mm, respectively (Felicísimo et al., 2011). Detailed information about the study area can be found on pages 31 - 33.

#### Experimental design and soil sampling

We took soil samples from soils under the influence of holm oaks (defined a 0.5 m from the trunk) and from soils away from the tree influence (defined as more than 0.5 m distance from the trunk). As, in our locations, holm oaks were affected by some degree of dieback, we took soil samples from trees with different health status. Tree selection and soil sampling can be found on pages 34 – 38 from “Material y métodos” section.

#### Soil biogeochemical analysis

We characterized the chemical environment of each of the 156 soil samples. We measured soil pH, SOC,  $_{av}P$ ,  $NH_4^+$  - N,  $NO_3^-$  - N, following the methodology describes on page 38 from “Material y métodos”.

## **DNA extraction and bioinformatic analysis of 16S and ITS sequencing**

DNA extraction and bioinformatic analysis is described on pages 43 - 51. As a brief summary, we extracted soil DNA using PowerSoil DNA Isolation kit (MoBio, Laboratories, Inc) and we submitted the resulting DNA to the Research Technology Support Facility at Michigan State University, where they create the necessary libraries to carried out the metabarcoding of soil bacterial and fungal communities. After that, we performed the bioinformatic analysis of the sequences (pre-processing, overlapping, clustering, etc.) using Qiime 1.9.1 (Caporaso et al., 2010).

## **Core community analysis and co-occurrence networks**

The analysis of soil microbial core community and co-occurrence networks is explained in depth on pages 56 - 58. In these analyses, we studied the core community of soil microbiota for each of our land-use categories. We calculated co-occurrence networks for bacteria and fungi separately from each land-use category using the R package “spieceasi” (v. 1.0.2; Kurtz et al. (2015)). In these co-occurrence networks, nodes are bacteria or fungi OTUs, and links between nodes represent associations between the microorganisms (global network descriptors in Table 13). We estimated the importance of individual nodes with two complementary centrality metrics: Normalized Degree and Betweenness Centrality. Normalized Degree (ND) measures the proportion of connections a focal node has out of the total possible connections in its network. Nodes with high ND are local hubs, as they have direct links to a greater proportion of the community (Martín González et al., 2010). The Betweenness Centrality (BC) of a node quantifies the proportion of shortest paths between any two nodes in the network pass through the focal node. Nodes with high BC are connectors, as they link areas of the network that would otherwise be poorly connected (Martín González et al., 2010). Both metrics are normalized within each network, allowing direct comparisons across networks. Topological keystone species are local hubs (OTUs with high ND), connectors (OTUs with high BC) or network hubs (OTUs with both high ND and BC), and maintain the overall network structure and dynamics through their linkage architecture (Martín González et al., 2010; Banerjee et al., 2016b). To identify keystone taxa, we established thresholds in these centrality metrics based on the distribution of centralities among species: a threshold of ND=0.8 for bacterial and fungal networks and all land-use categories, whereas the threshold for BC ranged



## CAPÍTULO 2

between 0.5-0.8 in bacteria and fungi and among the land-use categories (Tables 9 & 10, Figures 18 & 19).

### **Statistical analyses**

We performed all statistical analyses on R v. 3.5.1 (R Core Team, 2016) and the packages “phyloseq” (v. 1.24.2; McMurdie and Holmes (2013)) and “vegan” (v. 2.5-4; Oksanen et al. (2019)). We used the Shannon, Inverse Simpson and Pielou’s evenness indexes to calculate the alpha diversity and evenness of the core microbiota community and examined potential differences between land-use categories with an ANOVA with Tukey’s HSD correction. We visualized dissimilarities in the core community composition among different land-use categories through a NMDS of the beta diversity for each microbial community, using the Bray distance as a dissimilarity index and 500 tries to achieve data convergence (Oksanen et al., 2019). We thereafter compared the relative abundance of phyla among land-uses with an ANOVA with Tukey’s HSD correction and studied the relationship between phyla abundance and environmental variables with a correlation heatmap using the function “taxa.env.correlation” (“microbiomeSeq”; Lahti and Shetty (2017)). Environmental variables included climate (MAT and MAP), pH, tree defoliation, tree influence and soil nutrients [soil organic carbon (SOC), ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup> - N), nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup> N) and available phosphorus (avP)]. We duplicated the previous analyses related to relative abundance of phyla and the correlation heatmap for the study of our keystone OTUs.

## Results

### Core community analysis

Our complementary analyses on different aspects describing the core community of soil microbiota showed how the composition, structure and sensibility of soil microbiota differed along the gradient in land-use intensity. Furthermore, although the relative abundance of bacterial and fungal communities in dehesas differed from that of open woodlands and forests (Table 8), these responded differently to other variables associated with land-use intensity. Specifically, alpha and beta diversity of the core bacterial communities differed significantly across land-use categories (Table 7, Figure 12a). Co-occurrence networks confirmed these differences, and further showed that the structure of the core community was more similar between forest and open woodlands (Tables 9 & 10). Contrastingly to bacteria, fungal alpha diversity remained almost unaltered among the land-use categories (Table 7), and there was a complete overlap in the beta diversity between forest and open woodlands core communities (Figure 12b).

Regarding environmental and soil variables (Figure 13), core bacterial communities showed the strongest association with  $\text{NH}_4\text{-N}$ , pH, and  $\text{avP}$  in forests; with MAT and pH in open woodlands; and with  $\text{avP}$ , climate (MAT and MAP), pH and tree influence in dehesas. Contrastingly, only one fungal phylum, Mortierellomycota, was affected in the forests, while in open woodlands, pH was the only relevant variable, having significant correlations with all phyla except Mortierellomycota, which here was solely affected by MAP. Finally, Ascomycota and Basidiomycota were highly affected by climate and soil nutrients (SOC,  $\text{NH}_4\text{-N}$ ,  $\text{NO}_3\text{-N}$ ) in dehesas.

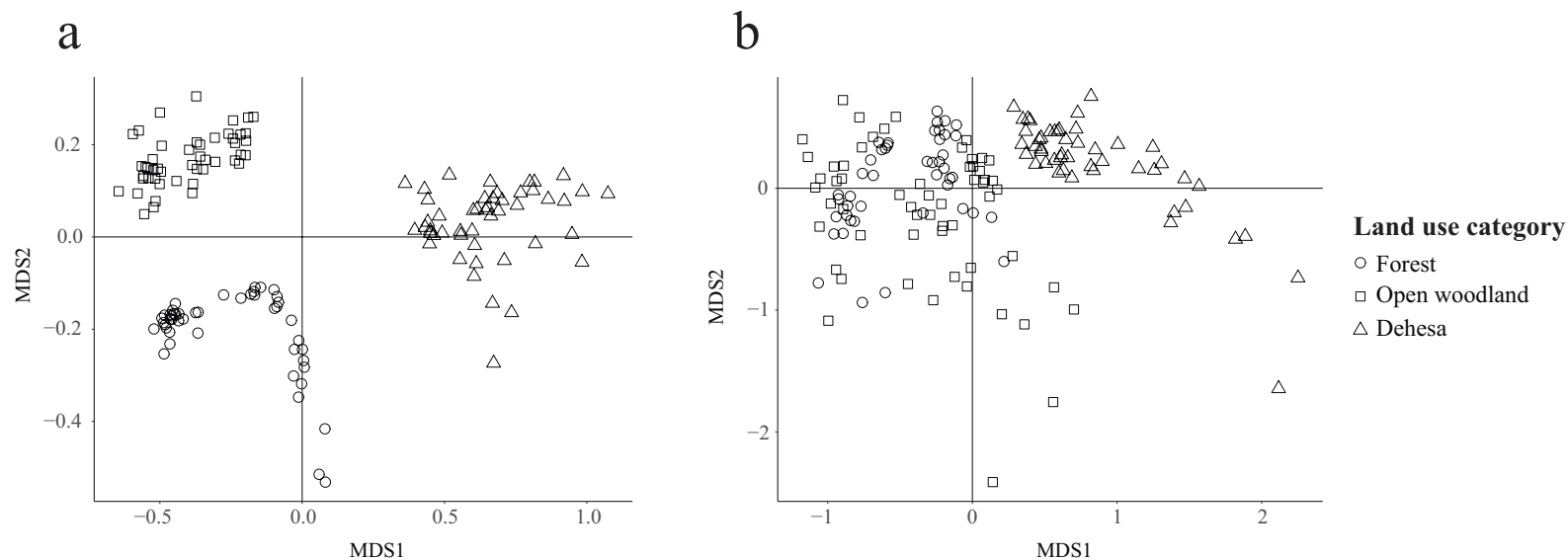
**Table 7.** Means (SE) of alpha diversity from the core community of soil bacteria and fungi in the different land-use categories. Different letters denote statistically significant differences ( $P < 0.05$ ).

		Land-use category		
Index		Forest	Open Woodland	Dehesa
Bacteria	Shannon	4.77 (0.03) A	4.93 (0.02) B	5.16 (0.02) C
	InvSimpson	64.34 (2.42) A	77.34 (2.90) B	88.29 (2.51) C
	Evenness	0.86 (0.00) A	0.87 (0.00) A	0.88 (0.00) B
Fungi	Shannon	3.40 (0.06) A	3.37 (0.07) A	3.57 (0.09) A
	InvSimpson	17.70 (1.30) A	17.63 (1.26) A	20.17 (1.57) A
	Evenness	0.73 (0.00) A	0.71 (0.01) A	0.71 (0.02) A

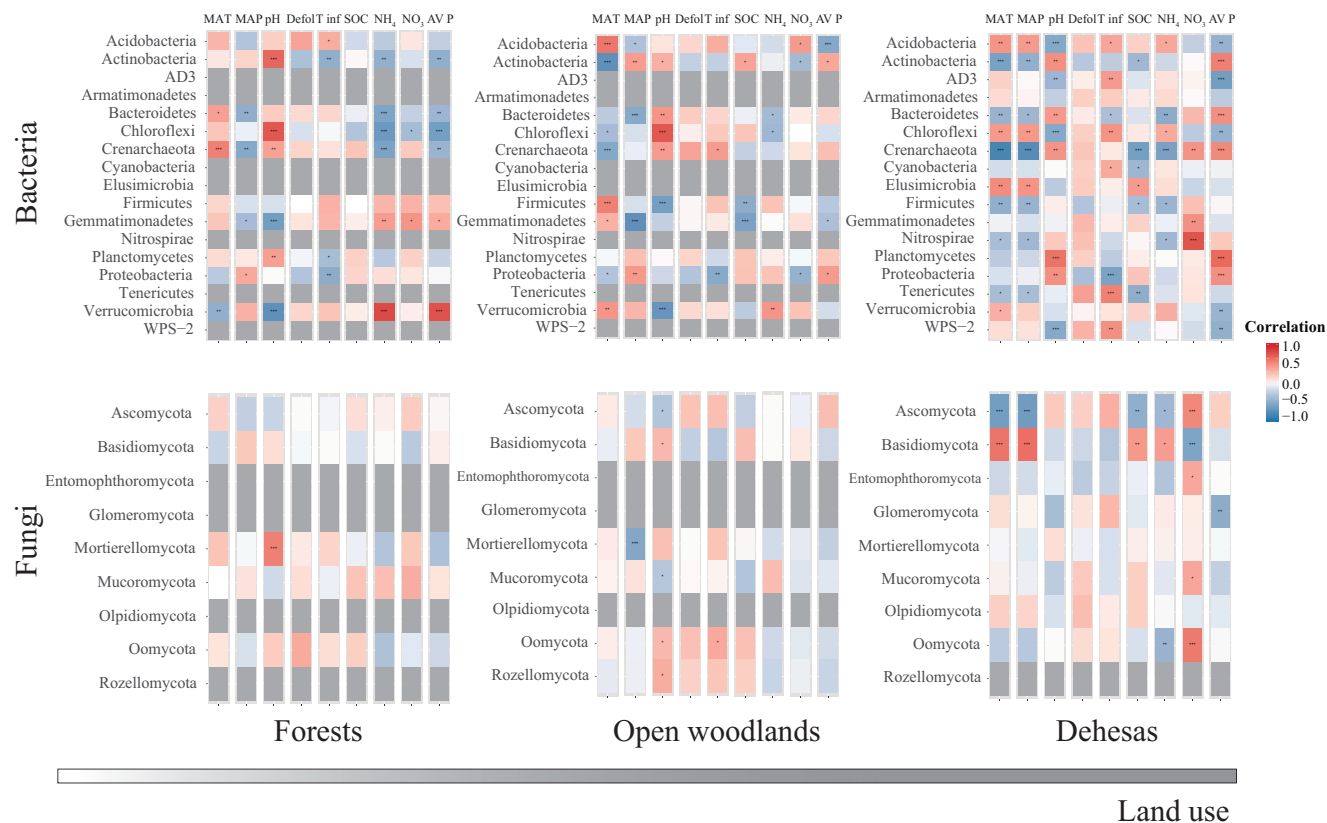
## CAPÍTULO 2

**Table 8.** Means (SE) of the relative abundance of the core community of soil bacteria and fungi in the different land-use categories. Different letters denote statistically significant differences ( $P < 0.05$ ).

Soil community	Phylum	Land-use category		
		Forest	Open woodland	Dehesa
Bacteria	Acidobacteria	26.82 (0.61) A	27.93 (0.85) A	28.37 (0.79) A
Bacteria	Actinobacteria	10.49 (0.65) A	8.97 (0.63) A	5.62 (0.26) B
Bacteria	AD3	0.00 (0.00) A	0.00 (0.00) A	0.32 (0.07) B
Bacteria	Armatimonadetes	0.00 (0.00) A	0.00 (0.00) A	0.08 (0.00) B
Bacteria	Bacteroidetes	12.06 (0.65) A	11.13 (0.62) A	11.89 (0.61) A
Bacteria	Chloroflexi	0.98 (0.15) A	0.95 (0.08) A	3.62 (0.68) B
Bacteria	Crenarchaeota	1.07 (0.10) A	0.47 (0.06) B	1.05 (0.14) A
Bacteria	Cyanobacteria	0.00 (0.00) A	0.00 (0.00) A	0.29 (0.11) B
Bacteria	Elusimicrobia	0.00 (0.00) A	0.00 (0.00) A	0.09 (0.00) B
Bacteria	Firmicutes	0.96 (0.18) A	0.97 (0.13) A	2.11 (0.33) B
Bacteria	Gemmatimonadetes	1.16 (0.14) A	1.43 (0.17) B	1.09 (0.07) C
Bacteria	Nitrospirae	0.00 (0.00) A	0.00 (0.00) A	0.09 (0.01) B
Bacteria	Planctomycetes	2.82 (0.11) A	3.37 (0.09) B	2.47 (0.10) C
Bacteria	Proteobacteria	33.45 (0.58) A	37.01 (0.68) B	32.35 (0.76) A
Bacteria	Tenericutes	0.00 (0.00) A	0.00 (0.00) A	0.15 (0.02) B
Bacteria	Verrucomicrobia	10.20 (1.03) A	7.78 (0.58) B	10.31 (0.52) A
Bacteria	WPS-2	0.00 (0.00) A	0.00 (0.00) A	0.11 (0.02) B
Fungi	Ascomycota	64.37 (2.10) A	54.24 (2.83) B	58.40 (03.01) AB
Fungi	Basidiomycota	29.59 (2.19) A	37.47 (3.02) A	36.92 (3.07) A
Fungi	Entomophthoromycota	0.00 (0.00) A	0.00 (0.00) A	0.05 (0.02) B
Fungi	Glomeromycota	0.00 (0.00) A	0.00 (0.00) A	0.15 (0.04) B
Fungi	Mortierellomycota	3.99 (0.44) A	4.83 (0.49) A	1.28 (0.39) B
Fungi	Mucoromycota	1.95 (0.32) A	3.04 (0.41) A	2.94 (0.40) A
Fungi	Olpidiomycota	0.00 (0.00) A	0.00 (0.00) A	0.04 (0.03) B
Fungi	Oomycota	0.09 (0.02) A	0.37 (0.07) B	0.21 (0.04) C
Fungi	Rozellomycota	0.00 (0.00) A	0.05 (0.02) B	0.00 (0.00) A



**Figure 12.** Non-metric multidimensional scaling of beta diversity from soil a) bacterial and b) fungal core communities according to land-use category.



**Figure 13.** Correlation heatmap of the bacterial and fungal core communities with abiotic variables (climate and pH), tree influence and soil nutrients pools for each land-use. Grey colors denote the absence of that phylum in that land-use category. MAT = Mean annual temperature, MAP = annual precipitation, Defol = holm oaks' defoliation degree, T inf = tree influence, SOC = Soil Organic Carbon, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N = soil Ammonium, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N = soil Nitrate and avP = Available Phosphorus.

### Keystone taxa analysis

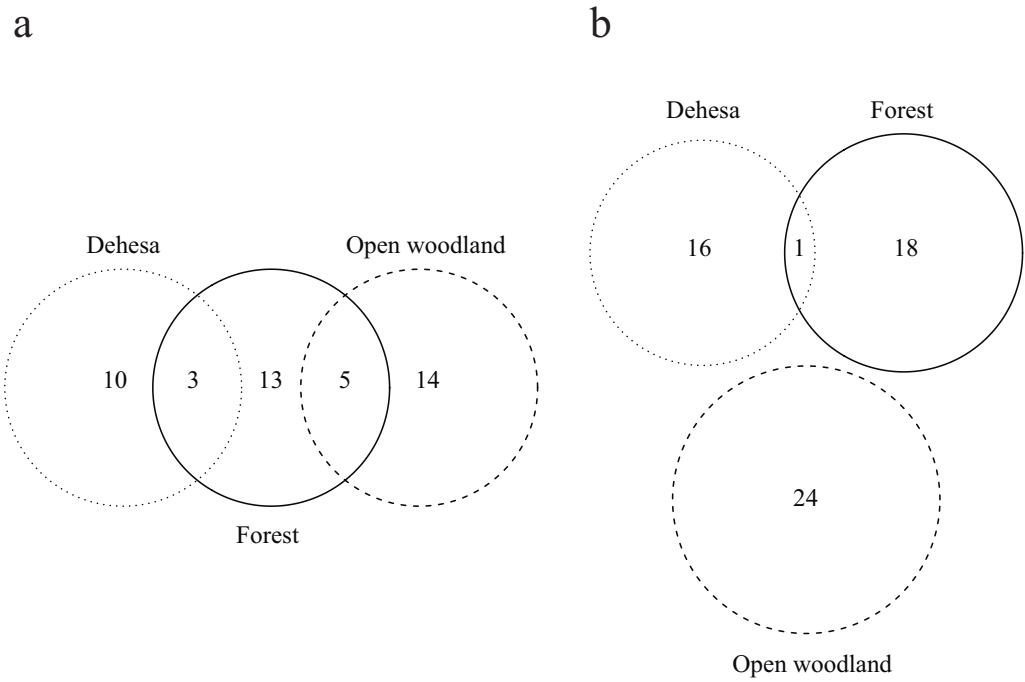
The different land-use categories differed in the number and taxonomical composition of their keystone taxa (Figure 14, Table 9 & 10). Only nine of these bacterial and fungal keystones were found in more than one land-use category (Figure 14), with forests showing the highest number of shared OTUs (Tables 9 & 10). Regarding the relative abundance of keystone bacterial and fungal phyla, most keystone species varied in relative abundance between the land-use categories, but there was no clear pattern on this variation (Table 11).

Examining the bacterial keystone networks (Figures 15 & 16), local hubs were only present in forests, where they formed a highly linked area. This structure is lacking in the open woodland and dehesas networks, which were on the contrary more modular. Accordingly, the keystone type profile (network hubs-connectors-local hubs) differs along the gradient, with forest having 2-6-13, compared to 3-16-0 from open woodlands, and 7-5-0 in dehesas (Figure 15). Fungal keystone networks showed an opposite pattern, where forests had the sparsest and the only network without hubs (Figures 15 & 16). The proportion of connectors increased along the gradient in land-use intensity, with keystone type profiles (network hubs-connectors-local hubs) as follows: 5-14-0, 6-17-1 and 9-7-1. Most keystones belonged to Ascomycota (81.7 %), the phylum with the highest relative abundance across all land-use categories. Ascomycota keystones acted as network hubs, connectors, and local hubs. Contrastingly, keystone species belonging to other phyla only acted as connectors and only in some land-use categories — Basidiomycota in all land-uses, and Mortierellomycota (1.7%) and Mucoromycota (3.3%) saprotrophs, only in open woodlands — despite their relative abundance did not vary significantly from that of forests and dehesas (Table 8; only Mortierellomycota, having one keystone connector in open woodland, had a significantly lower relative abundance in dehesas). We were able to retrieve guild information for ~60% of the keystone fungal species but could not identify any pattern in terms of guilds and keystone type or land-use category (Table 10).

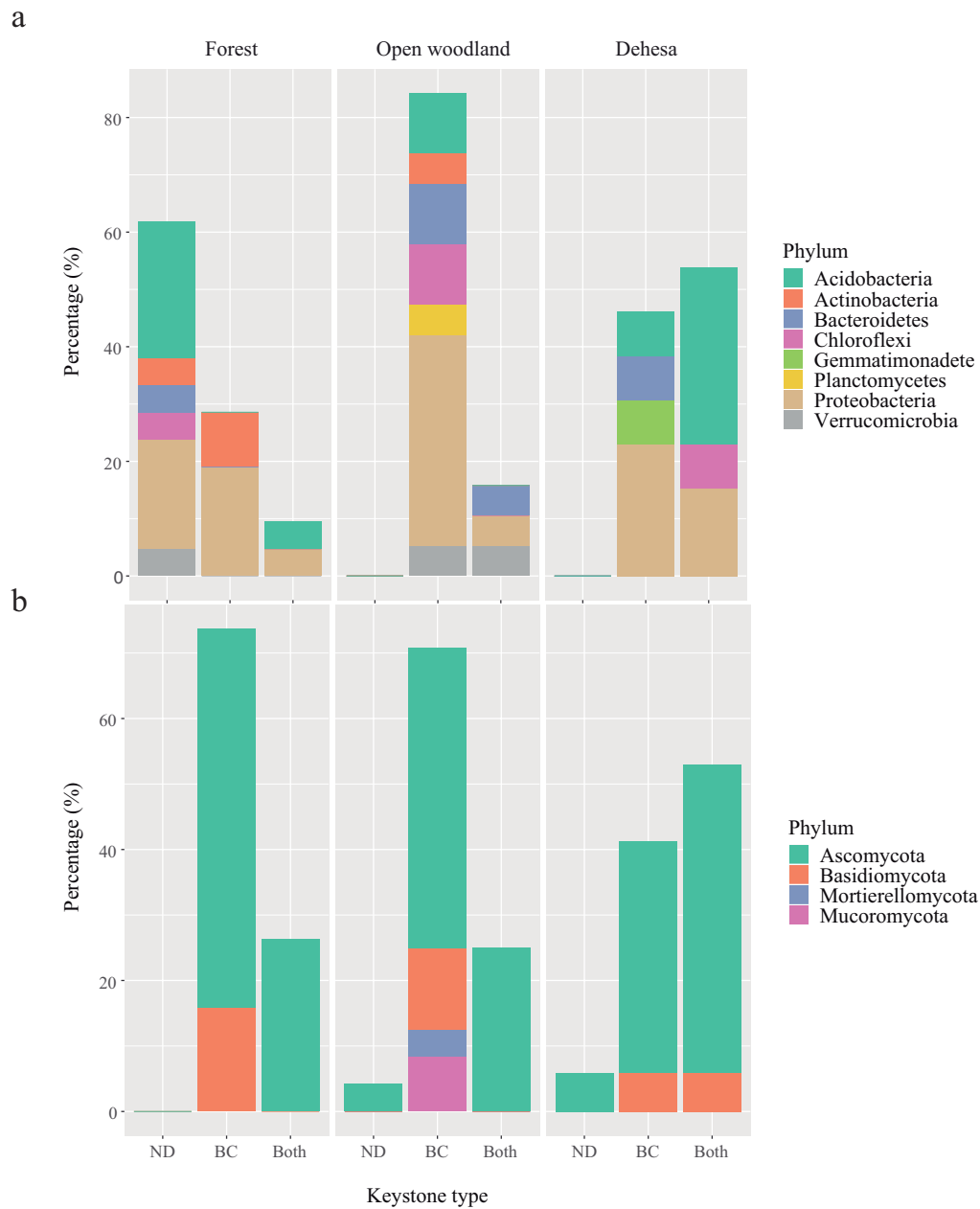
The analysis of abiotic variables and soil biogeochemistry for keystone taxa showed different sensibilities in the different land-use categories that resemble that of the core community (Figure 17). In general, keystone bacteria were highly affected by pH in all land-use categories. Apart from pH, in forests, the concentration of limiting

CAPÍTULO 2

nutrients, like  $\text{avP}$  and  $\text{NH}_4\text{-N}$ , had also a large effect, whereas in open woodlands, keystone bacteria were mostly affected by SOC and MAT, and in dehesas by climate (MAT and MAP) and tree presence (Figure 17). Fungal keystone species were also highly sensible to the effect of pH, but also to limiting nutrients like  $\text{NH}_4\text{-N}$  and  $\text{avP}$  in forests, and SOC and climate in dehesas. No clear patterns were found in the open woodlands, where two more additional phyla were also identified as keystone connectors (Mortierellomycota and Mucoromycota).

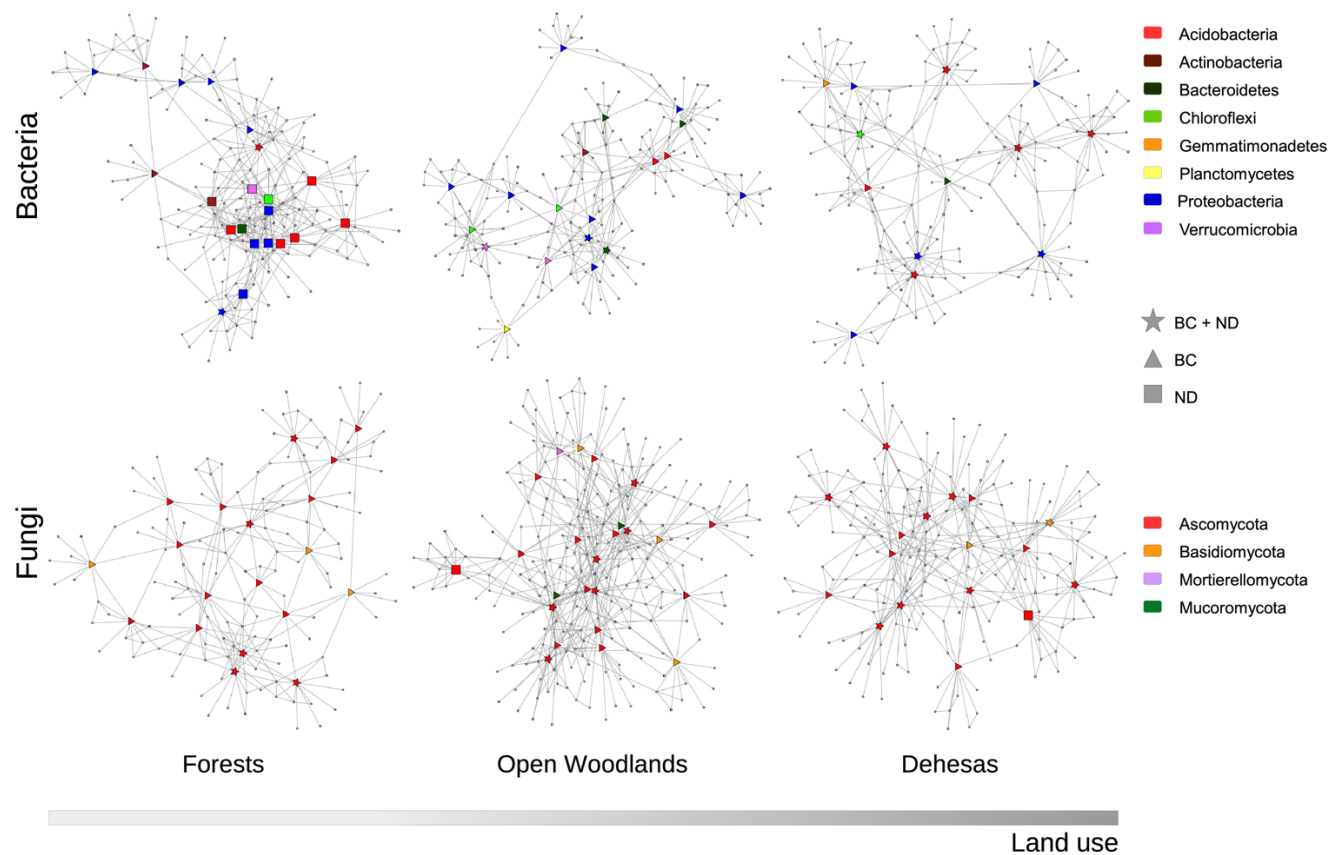


**Figure 14.** Venn diagrams showing number of OTUs in common between the different land-use categories for soil a) bacteria and b) fungi.



**Figure 15.** Summary of keystone species. Normalized Degree (ND) measures the number of connections of a node. Keystone OTUs with high ND are hubs, as they are directly linked to a greater proportion of the community. Betweenness centrality (BC) measures how many shortest paths between any two nodes in the network contain the focal node. keystones with high BC are connectors, as they link areas of the network that are otherwise poorly connected. Percentage of keystone according to their type in a) soil bacteria and b) soil fungi for each land-use category.





**Figure 16.** Soil microbial networks representing the structure shaped by bacterial and fungal keystones among land-use categories. Networks include only keystone nodes and their immediate neighbors. BC: keystones with high betweenness centrality (connectors); ND: keystones with high normalized degree (local hubs); BC + ND: keystones with high betweenness centrality and normalized degree (network hubs).

## Discussion

Our study provides evidences about changes in composition and structure of the co-occurrence network of soil microbial communities associated with land-use intensity. Results obtained indicates that bacterial co-occurrence network was especially sensitive to changes in land-use, both in the general core community and among keystone OTUs. Also, the structure of the co-occurrence network of the core bacterial communities and the identity and abundance of bacterial keystone species was more sensitive to the gradient of climate, pH and nutrient availability of the study than that of the fungal communities. Hence, it is clear that fungal and bacterial communities from Holm-oak forest show very different sensitivity to the broad gradients of land-use intensity and environmental conditions of this study. On the other hand, abandonment of intense use (open woodlands) suggest that this trend can be to some extent naturally reverted with the abandonment of the anthropogenic activities. Our results further show how patterns found in core communities were also highly replicated in keystones species, suggesting that keystone species, as defined in our study, are species with a strong functional impact over the behavior of the whole microbial community. In this hyper-diverse communities, defining a reduced number of the keystone species, may be very useful to improve our understanding of the functioning and sensitivity of soil microbial communities to the environment.

### **Abandonment of intensively managed ecosystems facilitates recovery of soil microbiota**

As in previous studies (de Carvalho et al., 2016; Szoboszlay et al., 2017; Petersen et al., 2019), the transformation of forest to agroecosystems resulted in an increase in soil bacterial taxonomic diversity, possibly as a consequence of an increase in the abundance and diversity of the herbaceous layer (Solly et al., 2014). Nevertheless, while soil bacteria showed a clear shift in their diversity, the fungal community remained highly unaltered along the axis of land-use, showing a higher resilience to transformations of the landscape associated with human activities (Urcelay et al., 2009; Griffiths and Philippot, 2013). This resilience might be associated to a better established plant-fungi interactions (Furze et al., 2017), since mycorrhizal networks conferred them the capacity to better tolerate the decrease in soil C and nutrients (Van Der Heijden and Horton, 2009; Barto et al., 2012) and/or to the capacity that some

## CAPÍTULO 2

fungi possess to the formation of spores, giving them the possibility to persist to environmental and/or human perturbations (Picone, 2000; Violi et al., 2008).

On the other hand, although soil bacterial abundance was different in natural (forests) and highly managed (dehesas) ecosystems, their dominant phyla remained highly unaltered, showing how ubiquitous bacterial phylum are among different locations and soils (Fierer, 2017). However, some of these phyla showed clear differences between forests and dehesas. In dehesas, where the distribution of trees is scatter and the herbaceous substrate prevailed (Diaz et al., 1997; Guzmán Álvarez, 2016), we found that phyla related to C availability, like Actinobacteria and Planctomycetes, decreased their abundances in comparison to forests (Wang et al., 2015; Banerjee et al., 2016b). Furthermore, dehesas ecosystems showed also an increase in the abundance of Firmicutes and Chloroflexi, which have been reported before by being associated with animal grazing in agroecosystems (Jangid et al., 2008; Petersen et al., 2019). This increase might be related with animal deposition since Firmicutes is a well-known rumen microbiota phylum (Guo et al., 2008; Min et al., 2019)

As we can see from these results, the contribution of trees can modulate the effect of soil microbial communities, demonstrating the importance of plant-soil interactions in the structure and diversity of soil microorganism. In this regard, we here showed that this process of aboveground spontaneous forest establishment following the abandonment of dehesas was aligned with a parallel recovery of the forest soils belowground structure and taxonomic diversity of the microbiota, i.e. the process of tree establishment after abandonment of dehesas was associated with a parallel convergence process of soil microbial diversities and compositions. This may support our hypothesis of soil microbial recovery to previous, and more natural, stages with secondary succession. Some studies have observed how land-use abandonment benefit the re-establishment of natural vegetation (trees and shrubs) (Rocha et al., 2016; Rolim et al., 2017) and the improvement of the soil nutrient quality and quantity (Zhao et al., 2005; Romero-Díaz et al., 2017). However, the processes that transform soil microbiota, affecting their diversity, composition and organization, after the abandonment of an intensive use are still unknown. We here speculate that tree recovery (seedlings) after abandonment increases labile forms of C from above (leaves) and belowground (root exudates), explaining the rapid increment of copiotrophic-like phylum such as Actinobacteria and Proteobacteria as well as the

decrease observed under open woodlands in the presence of phyla more associated with the decomposition of a more recalcitrant form of C such as Verrucomicrobia (Fierer et al., 2013; Banerjee et al., 2016a). The study of bacterial keystone species confirmed these results: forest and open woodlands shared 5 common keystone species, in contrast with the lack of common keystone species found between open woodland and dehesas. Furthermore, the *Rhizobiales* order, characterized by its capacity to capture N and by promoting its exchange to aboveground vegetation (Jones, 2015), were only found in forest and open woodland, suggesting a possible functional convergence among both ecosystems. The diversity of functions of the keystone species on the co-occurrence network also showed different pattern along the land-use gradient. While under forest the three different keystone types were represented (local hubs, connectors or network hubs), under open woodland and dehesas only two types of keystone species were observed (connectors and network hubs), which might suggest a network community more compartmentalized (Martín González et al., 2010). The complex aboveground structure found in these systems, where scattered trees creates patches with different microenvironmental conditions (grassland, shrubland or tree-dominated patches), may have favored this compartmentalization of the bacterial co-occurrence networks under open woodlands and dehesas (Joly et al., 2017). On the other hand, and in contrast to bacteria, the diversity and abundance of fungal core community remained highly unaltered along the land-use gradient, where 91 - 95% of the total fungal abundances belonged to Ascomycota and Basidiomycota (Fierer, 2017). These similarities found in all land-uses could be related to the formation of spores (Picone, 2000; Violi et al., 2008), giving them the ability to survive and proliferate under the regimes of environmental and anthropogenic perturbations at which they are exposed in this highly transformed systems. In spite of this, transformations of forest into dehesas presented some keystone species belonging to lower abundant fungal phyla (e.g. Mortiellomycota and Mucoromycota), apart from this the similarity in the diversity and structure of the soil fungal keystone species under forests and open woodlands with respect to dehesas (greater number of connectors under forests and open woodlands than under dehesas) further supported the hypothesis of the recovery of soil microbial structure associated with land abandonment.

### **Sensitivity to environmental variability and perturbations of soil microbial core communities from different land-use categories**

The observed lower sensitivity to geographical abiotic and nutrient variability of fungi with respect to bacteria may be related to the capacity of fungi to generate resistance forms (Picone, 2000; Violi et al., 2008), or to their capacity to produce hyphal network, which conferred them the capacity to tolerate soil nutrient scarcity or even less favor moisture conditions (drought) (Curiel Yuste et al., 2011; Barto et al., 2012; Simard et al., 2012). In this sense, bacterial communities were highly sensitive to regional fluctuations in soil pH, independently to land-use intensity, while fungi remained highly unaffected. The effect of pH in shaping the structure and diversity of soil microbiota has been thoroughly studied (Fierer and Jackson, 2006; Lauber et al., 2009; Rousk et al., 2010; Banerjee et al., 2016a; Delgado-Baquerizo et al., 2018). It is well known that soil fungi have the capacity to grow in environments with a wide pH range (between 5-9 units) without present any significant decrease (Rousk et al., 2010) or even increased in acidic soils (Grosso et al., 2016), which could be modulating the persistence of these phyla. Fierer and Jackson (2006) explained how soil pH could determine bacterial diversity and richness, showing their maximum peak in neutral soils. Nonetheless, the bacterial evaluated in this study did not present their highest in this range of pH, since the greatest richness and evenness was shown in the acidic soils from dehesas (5.58 units). This difference in pH peaks might be explained by the higher values of precipitation found in these locations, which may provide a better microenvironmental condition to grow (Delgado-Baquerizo et al., 2018) or even to the higher aboveground diversity found in dehesas ecosystems where herbaceous content is predominant (Pulido et al., 2010).

Our results further show that bacterial communities under the most transformed systems (dehesas) were also the most sensitive to the environmental gradient of the study, whereas microbial communities under forest were the less affected by these environmental gradients. For instance, while soil pH is a soil variable that has the capacity to transform soil bacterial communities in all different land-uses, their sensitivity to climate was strongly dependent on the land-use, being soil microbiota under forest less sensitive to the climatic variability. This resilience could be associated with the fact that trees are a natural buffer against climatic fluctuations, intercepting radiation and controlling temperature and moisture through evapotranspiration, conferring forests the ability to tolerate to some extent changes on MAP and MAT

(Barba et al., 2016a). Therefore, the more scattered distribution of trees in dehesas (Moreno and Pulido, 2009) confer overstorey less buffer capacity to protect soils against climatic variability, which could be related to the sensitivity presented by soil bacteria and the most abundant fungi (Ascomycota and Basidiomycota). Likewise, the bacterial core community and keystone species from dehesas were more sensitive to the presence of trees, while soil fungal communities remained unaltered independently of the land-use intensity. Hence, soil bacterial communities under the most intensively used systems were the most sensitive to the alterations in C and nutrient availability associated with the presence of trees (de Graaff et al., 2010; Lange et al., 2015). In contrast, forests bacteria presented a higher sensitivity to variability in available nutrients, as  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  and  $\text{avP}$ , probably because under more dense canopies, competition for mineral resources is also much stronger than under sparser overstoreys (Sardans et al., 2004; Fichtner et al., 2012; Grossiord et al., 2014). Both nutrients are highly important for microbial cell formation and metabolisms, as N is an essential component of enzymes (Stein and Klotz, 2016), playing also a key role in the aerobic oxidation of SOC (Hobbie et al., 2012) and P is a structural element in nucleic acid (Spohn and Widdig, 2017) which also play a role in soil nitrification by facilitate the release of litter N (Norman and Barrett, 2014; Mori et al., 2017). Hence, our results show that land-use intensity not only transform the structure and organization of microbial communities, but also determines their sensitivity to different limiting factors: under sparser overstoreys microbial communities might be more sensitive to climatic variability and spatial variability of tree influence, whereas in forest, microbial communities might especially sensitive to variability in essential mineral nutrients.

Abandonment of dehesas (open woodland) resulted in microbial communities less sensitive to climate or tree influence, supporting the fact that recovery of the original structure of soil microorganisms after dehesas abandonment was also associated with the recovery of the stability of these communities. In this intermediates state, keystone species were specially sensitivity to SOC variability, probably because the recovery of the original forest structure also increases the presence of labile forms of C in the soil from root exudation and increases in litter deposition (Blagodatskaya and Kuzyakov, 2008) that stimulates the proliferation of copiotroph microorganisms within the community (Pascault et al., 2013; Goberna et al., 2016; Yan et al., 2018). This intermediate state also coincided with a peak in the phylogenetic diversity of the fungal keystone species, with presence of fungi from less abundant phyla as Mucoromycota and Mortierellomycota, not present in forest and dehesas. The presence of these phyla

in this intermediate state, classified as saprotrophic fungi (Lehmann et al., 2020), are probably related to the increase in more complex structural molecules such as lignin and hemicellulose, from the proliferation of seedlings and shrubs. This increase in saprophytic fungi is key to decompose those complex molecules to further provide with labile C to bacteria (Purahong et al., 2016), which also explains why in open woodlands some keystone species are directly associated with the decomposition of both labile and recalcitrant forms of C (belonging to the phyla Actinobacteria and Verrucomicrobia, respectively (Fierer et al., 2013; Banerjee et al., 2016b)).

### Conclusions

In conclusion, in our gradient of land-use intensity, natural forests and dehesas showed clear differences in their soil core microbial structure and composition with less copiotroph phyla in the most managed ecosystem. Nonetheless, the abandonment of the most intensive use in dehesas and the subsequent gradual recovery of the aboveground vegetation towards forest-like ecosystems, resulted in a parallel recovery on the structure of the taxonomic composition and co-occurrence networks of the belowground microbiota. In this regard, woodlands ecosystems showed communities dominated by copiotroph bacteria and saprotroph fungi suggesting an increase in soil C sources, probably from the proliferation of seedling and shrubs. Besides, land-use seem to modulate the sensitivity of the soil core community from bacteria and fungi. While dehesas showed a bacterial community more sensitive to climate probably linked to the limited capacity of open woodlands to buffer atmospheric climatic variability, the bacterial core community under forests only exhibited sensitivity to variability in mineral forms of essential nutrients (e.g. ammonium and available P) associated with a higher competition between the different trees found in natural ecosystems. Our results further show how the soil fungal communities were, in general, less sensitive to environmental fluctuations regardless the land-use intensity, which suggest that soil fungi are more resilient to perturbation, probably due to their capacity to produce an hyphal network, which conferred them the capacity to tolerate soil nutrient scarcity or even less favor moisture conditions.

## Supplementary material

**Table 9.** Summary of bacterial keystone taxa found in each land-use category.

Land-use category	ID	Taxonomy (Phylum, Class, Order, Family)	Keystone Type
Forest	OTU_01	Acidobacteria, Solibacteres, Solibacterales, Solibacteraceae	Local hub
Forest	OTU_02	Acidobacteria, iii1-8, DS-18	Local hub
Forest	OTU_03	Acidobacteria, Acidobacteria-6, iii1-15, mb2424	Network hub
Forest	OTU_04	Acidobacteria, Acidobacteria-6, iii1-15	Local hub
Forest	OTU_05	Acidobacteria, Acidobacteria-6, iii1-15	Local hub
Forest	OTU_06	Acidobacteria, Acidobacteriia, Acidobacteriales, Koribacteraceae	Local hub
Forest	OTU_07	Actinobacteria, Actinobacteria, Actinomycetales, Microbacteriaceae	Local hub
Forest	OTU_08	Actinobacteria, Actinobacteria, Actinomycetales, Nocardiodaceae	Connector
Forest	OTU_09	Actinobacteria, Actinobacteria, Actinomycetales, Streptomycetaceae	Connector
Forest	OTU_10	Bacteroidetes, Cytophagia, Cytophagales, Cytophagaceae	Local hub
Forest	OTU_11	Chloroflexi, Gitt-GS-136	Local hub
Forest	OTU_12	Proteobacteria, Betaproteobacteria, MND1	Network hub
Forest	OTU_13	Proteobacteria, Betaproteobacteria, Burkholderiales, Burkholderiaceae	Connector
Forest	OTU_14	Proteobacteria, Betaproteobacteria, Burkholderiales, Alcaligenaceae	Local hub
Forest	OTU_15	Proteobacteria, Alphaproteobacteria, Sphingomonadales, Sphingomonadaceae	Connector
Forest	OTU_16	Proteobacteria, Alphaproteobacteria, Rhizobiales, Phyllobacteriaceae	Local hub
Forest	OTU_17	Proteobacteria, Alphaproteobacteria, Rhizobiales, Bradyrhizobiaceae	Connector
Forest	OTU_18	Proteobacteria, Alphaproteobacteria, Rhodospirillales, Rhodospirillaceae	Connector
Forest	OTU_19	Proteobacteria, Alphaproteobacteria, Rhodospirillales, Rhodospirillaceae	Local hub
Forest	OTU_20	Proteobacteria, Gammaproteobacteria, Thiotrichales, Piscirickettsiaceae	Local hub
Forest	OTU_21	Verrucomicrobia, [Spartobacteria], [Chthoniobacteriales], [Chthoniobacteraceae]	Local hub
Open woodland	OTU_1	Acidobacteria, iii1-8, DS-18	Connector
Open woodland	OTU_2	Acidobacteria, [Chloracidobacteria], RB41	Connector
Open woodland	OTU_3	Actinobacteria, Actinobacteria, Actinomycetales, Nocardiodaceae	Connector
Open woodland	OTU_4	Bacteroidetes, [Saprospirae], [Saprospirales], Chitinophagaceae	Network hub



## CAPÍTULO 2

Open woodland	OTU_5	Bacteroidetes, [Saprospirae], [Saprospirales], Chitinophagaceae	Connector
Open woodland	OTU_6	Bacteroidetes, [Saprospirae], [Saprospirales], Chitinophagaceae	Connector
Open woodland	OTU_7	Chloroflexi, Anaerolineae, envOPS12	Connector
Open woodland	OTU_8	Chloroflexi, Gitt-GS-136	Connector
Open woodland	OTU_9	Planctomycetes, Planctomycetia, Pirellulales, Pirellulaceae	Connector
Open woodland	OTU_10	Proteobacteria, Betaproteobacteria, Burkholderiales, Comamonadaceae	Connector
Open woodland	OTU_11	Proteobacteria, Alphaproteobacteria, Rhizobiales, Methylocystaceae	Connector
Open woodland	OTU_12	Proteobacteria, Alphaproteobacteria, Sphingomonadales, Sphingomonadaceae	Connector
Open woodland	OTU_13	Proteobacteria, Alphaproteobacteria, Rhizobiales, Phyllobacteriaceae	Connector
Open woodland	OTU_14	Proteobacteria, Betaproteobacteria, Burkholderiales, Burkholderiaceae	Connector
Open woodland	OTU_15	Proteobacteria, Betaproteobacteria, MND1	Network hub
Open woodland	OTU_16	Proteobacteria, Betaproteobacteria, MND1	Connector
Open woodland	OTU_17	Proteobacteria, Alphaproteobacteria, Rhizobiales, Hyphomicrobiaceae	Connector
Open woodland	OTU_18	Verrucomicrobia, [Spartobacteria], [Chthoniobacterales], [Chthoniobacteraceae]	Network hub
Open woodland	OTU_19	Verrucomicrobia, [Spartobacteria], [Chthoniobacterales], [Chthoniobacteraceae]	Connector
Dehesa	OTU_1	Acidobacteria, Solibacteres, Solibacterales, Solibacteraceae	Network hub
Dehesa	OTU_2	Acidobacteria, Acidobacteriia, Acidobacteriales, Koribacteraceae	Network hub
Dehesa	OTU_3	Acidobacteria, Acidobacteriia, Acidobacteriales, Koribacteraceae	Network hub
Dehesa	OTU_4	Acidobacteria, Acidobacteriia, Acidobacteriales, Koribacteraceae	Connector
Dehesa	OTU_5	Acidobacteria, Acidobacteriia, Acidobacteriales, Koribacteraceae	Network hub
Dehesa	OTU_6	Bacteroidetes, [Saprospirae], [Saprospirales], Chitinophagaceae	Connector
Dehesa	OTU_7	Chloroflexi, Ktedonobacteria, Thermogemmatissporales, Thermogemmatissporaceae	Network hub
Dehesa	OTU_8	Gemmatimonadetes, Gemm-1	Connector
Dehesa	OTU_9	Proteobacteria, Betaproteobacteria, Burkholderiales, Burkholderiaceae	Network hub
Dehesa	OTU_10	Proteobacteria, Betaproteobacteria	Connector
Dehesa	OTU_11	Proteobacteria, Betaproteobacteria, Burkholderiales, Comamonadaceae	Connector
Dehesa	OTU_12	Proteobacteria, Gammaproteobacteria, Xanthomonadales, Sinobacteraceae	Network hub
Dehesa	OTU_13	Proteobacteria, Gammaproteobacteria, Xanthomonadales, Xanthomonadaceae	Connector

**Table 10.** Summary of fungal keystone taxa found in each land-use category.

Land-use	ID	Taxonomy (Phylum, Class, Order, Family)	FunGuild	Keystone type
Forest	OTU_1	Ascomycota, Sordariomycetes, Coniochaetales, Coniochaetaceae	Saprotroph	Connector
Forest	OTU_2	Ascomycota, Eurotiomycetes, Chaetothyriales, Herpotrichiellaceae	Saprotroph	Network hub
Forest	OTU_3	Ascomycota, Sordariomycetes, Coniochaetales	Unknown	Network hub
Forest	OTU_4	Ascomycota, Leotiomycetes, Leotiomycetes_ord_Incertae_sedis, Pseudeurotiaceae	Saprotroph	Connector
Forest	OTU_5	Ascomycota, Eurotiomycetes, Chaetothyriales, Herpotrichiellaceae	Saprotroph	Network hub
Forest	OTU_6	Ascomycota	Unknown	Connector
Forest	OTU_7	Ascomycota, Sordariomycetes, Xylariales, Xylariaceae	Endophyte	Network hub
Forest	OTU_8	Ascomycota, Eurotiomycetes, Eurotiales, Trichocomaceae	Saprotroph	Connector
Forest	OTU_9	Ascomycota, Eurotiomycetes, Chaetothyriales, Herpotrichiellaceae	Endophyte	Network hub
Forest	OTU_10	Ascomycota, Eurotiomycetes, Eurotiales, Aspergillaceae	Unknown	Connector
Forest	OTU_11	Ascomycota, Leotiomycetes, Leotiomycetes_ord_Incertae_sedis, Pseudeurotiaceae	Saprotroph	Connector
Forest	OTU_12	Ascomycota, Eurotiomycetes, Chaetothyriales	Unknown	Connector
Forest	OTU_13	Ascomycota, Sordariomycetes, Hypocreales	Unknown	Connector
Forest	OTU_14	Ascomycota, Eurotiomycetes, Eurotiales, Aspergillaceae	Unknown	Connector
Forest	OTU_15	Ascomycota, Eurotiomycetes, Chaetothyriales	Unknown	Connector
Forest	OTU_16	Ascomycota	Unknown	Connector
Forest	OTU_17	Basidiomycota, Agaricomycetes, Thelephorales, Thelephoraceae	Ectomycorrhizal	Connector
Forest	OTU_18	Basidiomycota, Agaricomycetes, Boletales, Melanogastraceae	Ectomycorrhizal	Connector
Forest	OTU_19	Basidiomycota, Agaricomycetes, Polyporales, Ganodermataceae	Plant Pathogen	Connector
Open woodland	OTU_1	Ascomycota, Eurotiomycetes, Eurotiales, Aspergillaceae	Unknown	Connector
Open woodland	OTU_2	Ascomycota, Leotiomycetes, Helotiales, unidentified	Unknown	Network hub
Open woodland	OTU_3	Ascomycota, Eurotiomycetes, Eurotiales, Aspergillaceae	Saprotroph	Network hub
Open woodland	OTU_4	Ascomycota, Sordariomycetes, Hypocreales, Hypocreaceae	Unknown	Connector
Open woodland	OTU_5	Ascomycota, Sordariomycetes, Coniochaetales, Coniochaetaceae	Saprotroph	Connector

## CAPÍTULO 2

Open woodland	OTU_6	Ascomycota, Sordariomycetes, Hypocreales, Clavicipitaceae	Animal Pathogen	Connector
Open woodland	OTU_7	Ascomycota, Eurotiomycetes, Chaetothyriales, unidentified	Unknown	Connector
Open woodland	OTU_8	Ascomycota, Eurotiomycetes, Eurotiales, Aspergillaceae	Unknown	Connector
Open woodland	OTU_9	Ascomycota, Pezizomycetes, Pezizales, Tuberaceae	Ectomycorrhizal	Local hub
Open woodland	OTU_10	Ascomycota, Eurotiomycetes, Chaetothyriales, Herpotrichiellaceae	Saprotroph	Connector
Open woodland	OTU_11	Ascomycota, Pezizomycetes, Pezizales, Pyronemataceae	Ectomycorrhizal	Network hub
Open woodland	OTU_12	Ascomycota, Eurotiomycetes, Chaetothyriales, Herpotrichiellaceae	Saprotroph	Connector
Open woodland	OTU_13	Ascomycota, Sordariomycetes, unidentified, unidentified	Unknown	Network hub
Open woodland	OTU_14	Ascomycota, Lecanoromycetes, Ostropales, unidentified	Unknown	Connector
Open woodland	OTU_15	Ascomycota, Sordariomycetes, Hypocreales, Hypocreaceae	Unknown	Connector
Open woodland	OTU_16	Ascomycota, unidentified, unidentified, unidentified	Unknown	Network hub
Open woodland	OTU_17	Ascomycota, Eurotiomycetes, Chaetothyriales, Herpotrichiellaceae	Saprotroph	Connector
Open woodland	OTU_18	Ascomycota, Eurotiomycetes, Eurotiales, Aspergillaceae	Unknown	Network hub
Open woodland	OTU_19	Basidiomycota, Agaricomycetes, Agaricales, Inocybaceae	Ectomycorrhizal	Connector
Open woodland	OTU_20	Basidiomycota, Microbotryomycetes, unidentified, unidentified	Unknown	Connector
Open woodland	OTU_21	Basidiomycota, Agaricomycetes, Thelephorales, Thelephoraceae	Ectomycorrhizal	Connector
Open woodland	OTU_22	Mortierellomycota, Mortierellomycetes, Mortierellales, Mortierellaceae	Saprotroph	Connector
Open woodland	OTU_23	Mucoromycotina_cls_Incertae_sedis, Mucoromycotina_ord_Incertae_sedis, Mucoromycotina_fam_Incertae_sedis	Unknown	Connector
Open woodland	OTU_24	Mucoromycota, Umbelopsidomycetes, Umbelopsidales, Umbelopsidaceae	Saprotroph	Connector
Dehesa	OTU_1	Ascomycota, Eurotiomycetes, Eurotiales, Trichocomaceae	Saprotroph	Connector
Dehesa	OTU_2	Ascomycota, Eurotiomycetes, Eurotiales, Trichocomaceae	Saprotroph	Connector
Dehesa	OTU_3	Ascomycota, Pezizomycetes, Pezizales, Pyronemataceae	Ectomycorrhizal	Network hub
Dehesa	OTU_4	Ascomycota, Sordariomycetes, Hypocreales, Ophiocordycipitaceae	Animal Pathogen	Network hub
Dehesa	OTU_5	Ascomycota, Eurotiomycetes, Chaetothyriales, Herpotrichiellaceae	Saprotroph	Connector
Dehesa	OTU_6	Ascomycota	Unknown	Connector
Dehesa	OTU_7	Ascomycota, Eurotiomycetes, Chaetothyriales, Herpotrichiellaceae	Saprotroph	Network hub

Dehesa	OTU_8	Ascomycota, Dothideomycetes, Pleosporales, Pleosporaceae	Unknown	Network hub
Dehesa	OTU_9	Ascomycota, Eurotiomycetes, Eurotiales, Trichocomaceae	Saprotroph	Local hub
Dehesa	OTU_10	Ascomycota, Sordariomycetes, Branch06	Unknown	Network hub
Dehesa	OTU_11	Ascomycota, Dothideomycetes, Dothideales, Dothioraceae	Saprotroph	Network hub
Dehesa	OTU_12	Ascomycota, Sordariomycetes, Xylariales	Unknown	Network hub
Dehesa	OTU_13	Ascomycota, Leotiomyces, Helotiales, Helotiales_fam_Incertae_sedis	Endophyte	Connector
Dehesa	OTU_14	Ascomycota, Eurotiomycetes, Chaetothyriales, Herpotrichiellaceae	Saprotroph	Connector
Dehesa	OTU_15	Ascomycota, Leotiomyces, Helotiales, Helotiales_fam_Incertae_sedis	Endophyte	Network hub
Dehesa	OTU_16	Basidiomycota, Agaricomycetes, Agaricales, Lycoperdaceae	Saprotroph	Connector
Dehesa	OTU_17	Basidiomycota, Agaricomycetes, Sebacinales, Sebacinaceae	Unknown	Network hub

**Table 11.** Mean (SE) of the relative abundance from keystone taxa of soil bacterial and fungal communities. Different letters denote statistically significant differences among land-use categories ( $P < 0.05$ ).

Soil community	Phylum	Land-use category		
		Forest	Open woodland	Dehesa
Bacteria	Acidobacteria	3.39 (0.27) A	0.28 (0.04) B	3.94 (0.25) A
Bacteria	Actinobacteria	0.80 (0.13) A	0.46 (0.46) B	0.00 (0.00) C
Bacteria	Bacteroidetes	0.71 (0.71) A	0.66 (0.06) A	0.56 (0.56) A
Bacteria	Chloroflexi	0.17 (0.17) A	0.41 (0.02) B	0.08 (0.08) A
Bacteria	Gemmatimonadetes	0.00 (0.00) A	0.00 (0.00) A	0.20 (0.20) B
Bacteria	Planctomycetes	0.00 (0.00) A	0.11 (0.11) B	0.00 (0.00) A
Bacteria	Proteobacteria	8.80 (0.52) A	3.29 (0.14) B	1.52 (0.10) C
Bacteria	Verrucomicrobia	0.25 (0.25) A	2.32 (1.05) B	0.00 (0.00) A
Fungi	Ascomycota	6.66 (0.19) A	5.23 (0.09) AB	3.57 (0.08) B
Fungi	Basidiomycota	0.94 (0.15) A	0.28 (0.01) B	0.18 (0.02) B
Fungi	Mortierellomycota	0.00 (0.00) A	0.09 (0.09) B	0.00 (0.00) A
Fungi	Mucoromycota	0.00 (0.00) A	1.60 (0.16) B	0.00 (0.00) A

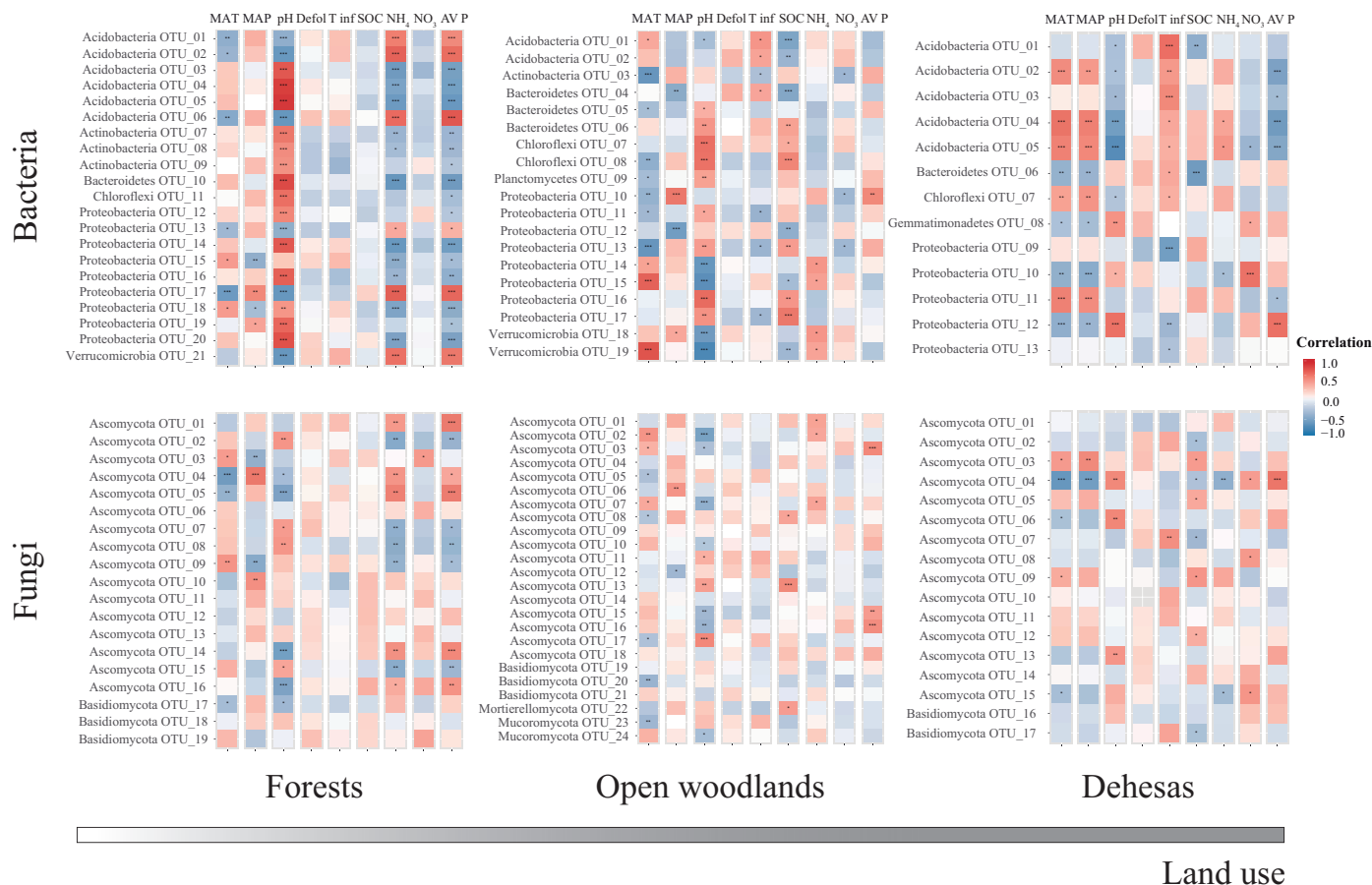
CAPÍTULO 2

**Table 12.** Means (SE) of soil variables according to holm oak land-use category. Different letters represent significant differences among land-use ( $P < 0.05$ ).

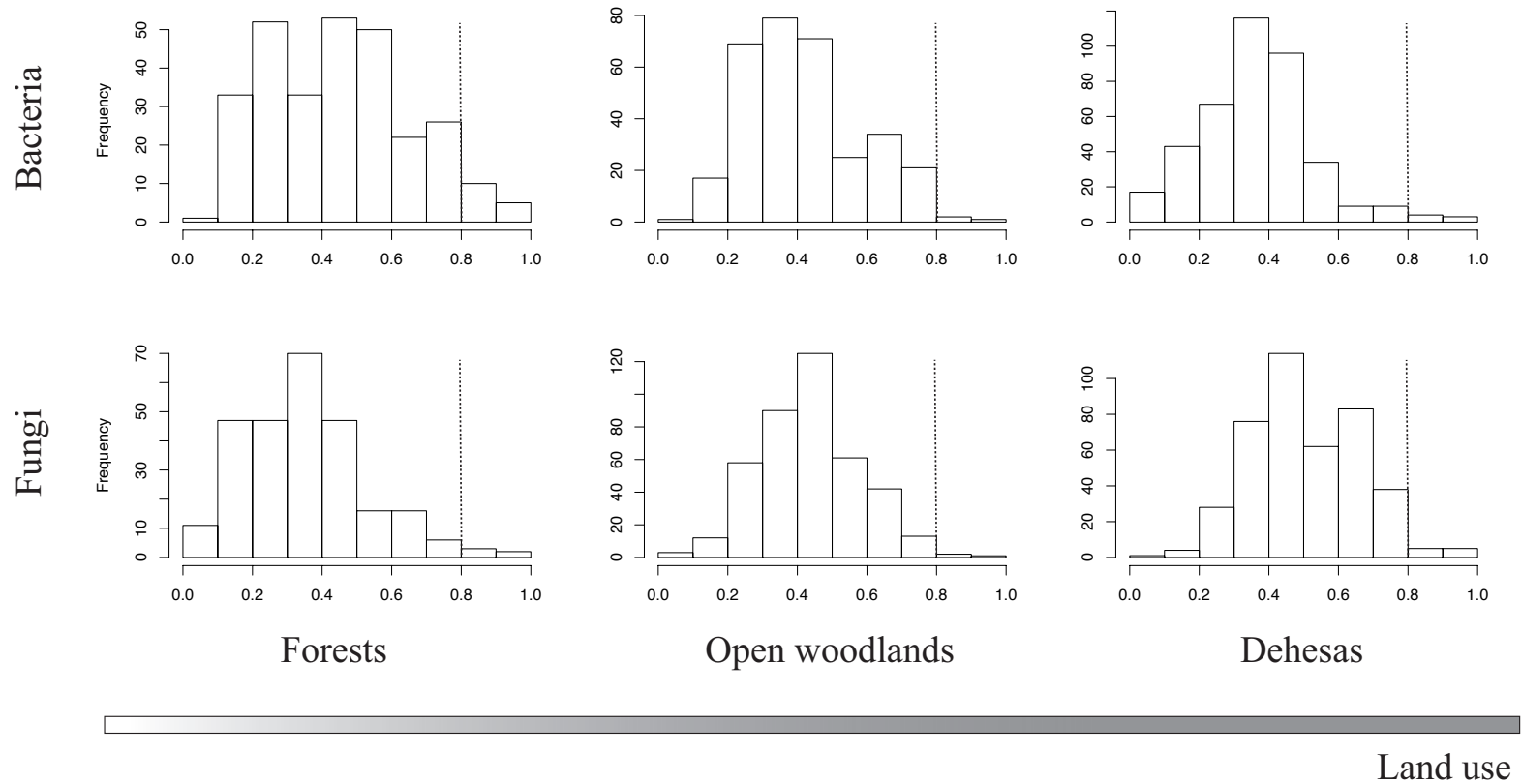
Variable	Land-use category		
	Forest	Open Woodland	Dehesa
MAT	13.38 (0.13) A	13.33 (0.23) A	14.31 (0.22) B
MAP	536.28 (5.34) A	587.22 (25.23) A	706.10 (17.86) B
pH	6.70 (0.14) A	7.01 (0.08) A	5.58 (0.07) B
SOC	2.47 (0.10) A	3.32 (0.19) B	2.39 (0.10) A
NH4+-N	145.75 (8.76) A	174.54 (4.47) B	223.12 (11.73) C
NO3--N	109.11 (12.53) A	99.59 (12.50) A	100.01 (10.34) A
Available P	0.23 (0.03) A	0.23 (0.03) A	0.26 (0.03) A

**Table 13.** Global topological parameters describing the core community from soil bacterial and fungal co-occurrence networks. Diameter measures the shortest distance, in terms of number of shortest paths, between the two most distant nodes in the network, hence describing network size. Average path length measures the average shortest distance between all pairs of nodes, hence describing the average number of links between any two nodes. Connectance quantifies the proportion of realized links out of all possible, hence describing the link density in the network.

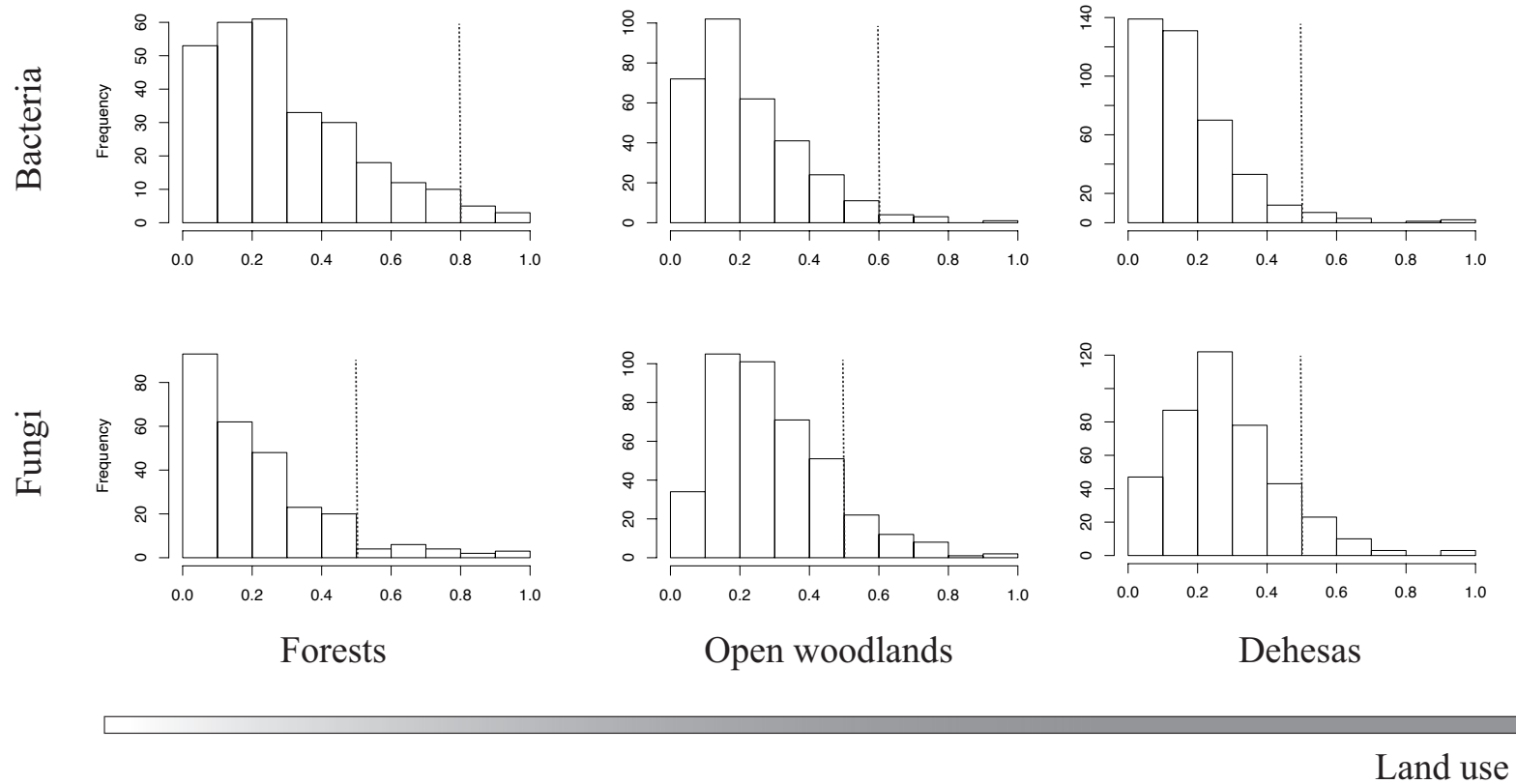
Networks	Land-use category	Number of OTUs	Diameter	Average path length	Connectance
Bacteria	Forest	285	6	3.282	3.835
Bacteria	Open woodland	320	6	3.310	3.820
Bacteria	Dehesa	398	8	3.330	4.028
Fungi	Forest	265	8	3.654	2.853
Fungi	Open woodland	407	6	3.090	4.610
Fungi	Dehesa	416	6	3.084	4.642



**Figure 17.** Correlation heatmap of the soil bacterial and fungal keystones with abiotic variables (climate and pH), tree influence and soil nutrients pools for each land-use. Grey colors denote the absence of that phylum in that land-use category. MAT = Mean annual temperature, MAP = annual precipitation, Defol = holm oaks' defoliation degree, T inf = tree influence, SOC = Soil Organic Carbon,  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  = soil Ammonium,  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  = soil Nitrate and  $\text{avP}$  = available Phosphorus.



**Figure 18.** Histograms to determine the thresholds in the degree centrality for the core communities of soil bacteria and fungi. The spotted line represents the threshold selected for each land-use.



**Figure 19.** Histograms to determine the thresholds in the betweenness metrics for the core communities of soil bacteria and fungi. The spotted line represents the threshold selected for each land-use.



**CAPÍTULO 3:** Land-use modulates soil bacterial and fungal diversity after drought-induced decline in Holm-oak Mediterranean ecosystems

## Summary

The magnitude of the effects of climate-change induced tree decline over diversity and structure of soil microbial communities is still poorly understood. In this sense, how resilient these communities are will determine the capacity of ecosystems to recover after episodes of tree decline. Although not taken so much into account, the use to which a forest has been subjected not only affects its ability to respond to climatic perturbations but also its ability to recover from the climate-induced mortality episodes. Here, we wanted to test how resilient soil microbial communities are to drought-induced tree decline and how forest management (land-use) can modulate the response of these communities after a perturbation triggered by tree mortality. For that, we studied soil microbial (bacteria and fungi) diversity and composition in natural forests, man-made intensively managed savannahs called *dehesas*, and open woodlands, formed from the abandonment of *dehesas*. In these three land-use scenarios, we investigated the effect of holm oak decline in soil microbial communities by sampling under healthy, affected and dead holm oaks, as well as from bulk soils away from tree influence. We used Illumina technology to estimate the alpha and beta diversity of the bacterial and fungal soil communities. We found out that soil microbial communities from forests and *dehesas* were taxonomically different and presented different responses to tree decline. For instance, in forests, structure and diversity of fungal communities remained highly unaltered, while bacterial communities experience strong changes during decline. In *dehesas*, the trend was the opposite of that found in forests, with a more resilient bacterial community and highly altered fungal community. On the other hand, both bacteria and fungi experienced changes during decline in open woodlands, lying between that under forests and that under *dehesas*. Our results, therefore, suggest that land-use determine the degree of soil bacterial/fungal resilience after climate-induced tree decline, demonstrating how the suppression of anthropic activities (abandonment of *dehesas*) reverts in a process of recovery of microbial communities towards values of diversity and taxonomic identity found in forests (long-term resilience).

### Introduction

Given the importance of soil microbial communities for the overall functioning of ecosystems (e.g. Van Der Heijden et al. (2008)), understanding how climate change and land-use affect soil microbial communities has become a relevant issue (Jangid et al., 2011; Barba et al., 2016a; de Carvalho et al., 2016; Bastida et al., 2019). Climate change-induced forest decline has been related to the increase on quantity and duration of drought episodes in the last decades (Adams et al., 2010; Allen et al., 2010; Anderegg et al., 2012; Hereş et al., 2018). Tree defoliation and dead (tree decline) induced by the increase in the length and intensity of water-limiting periods (droughts), triggers cascading effects that ultimately affects the structure and functioning of soil microbial communities (Curiel Yuste et al., 2012; de Sampaio e Paiva Camilo-Alves, 2013; Avila et al., 2016; Curiel Yuste et al., 2019). This is because trees transform the soil abiotic (microclimate, pH) and biotic (e.g. fine root production, secretion of exudates and enzymes, etc...) environment (e.g. Curiel Yuste et al. (2019)) of their surrounding soil, so changes in tree health and subsequent death greatly affects the microbial communities that inhabit it. In this regard, tree decline may exacerbate climate-induced changes in soil microbial communities, ultimately affecting soil stoichiometry and soil nutrient cycling (García-Angulo et al., submitted).

The impact of tree decline on soil microbial communities is not linear. In the early stages, tree decline generally results in an increase in soil carbon (C) due to the increment in litter (specially leaves and fine roots) deposition, and in a subsequent increase in soil CO<sub>2</sub> emissions (Kaňa et al., 2013). However, in the last stages of decline, when the trees dies, carbon labile forms are drastically reduced as the supply of radical exudates stops (Štursová et al., 2014). These decrease in labile C supply affects the structure of soil microbial communities, favoring soil microorganisms capable of decomposing more recalcitrant carbon (C) sources, as Verrucomicrobia (Martinez-Garcia et al., 2012) or saprotrophic fungi (Ma et al., 2013; Voříšková and Baldrian, 2013) over more copiotrophic microorganisms such as Proteobacteria (Pascault et al., 2013; Goberna et al., 2016; Yan et al., 2018). This decrease in the labile C source provided by trees has been further associated with a decrease in soil heterotrophic respiration and soil CO<sub>2</sub> emissions (Avila et al., 2016). On the other hand, the content of nitrogen (N) in soils will increase with tree decline due to an increment in N litter, altering soil stoichiometry and microbial communities (Griffin et al., 2011; Rodríguez et al., 2017).

However, it is expected that impacts of tree decline over the structure, taxonomic composition and functioning of microbial communities will be also regulated by how forests have been managed and which land-use have been given. For instance, it is expected that in dense and less managed forest, diversity and structure of microbial communities will be more resilient to an event of tree decline, since the system has more capacity to absorb perturbation and/or recover (Nave et al., 2011; Barba et al., 2013; Barba et al., 2016a). This is because depending on the scale of the mortality event, there is a fast-subterranean colonization of the microorganisms and roots associated with surrounding living trees and surrounding regenerated seedlings (Curiel Yuste et al., 2012; Curiel Yuste et al., 2019; Rodríguez-Calcerrada et al., 2019). However, it has been observed that changes in bacterial community structure may be fast after an event of tree mortality, preceding changes in soil carbon quality (Curiel Yuste et al., 2012). On the contrary, in open woodlands, where adult trees are sparse, and grasses dominate the understory vegetation, it is expected that tree decline will exert a strong change over the diversity and functioning of soil microbial communities (Rodríguez et al., 2017; Rodríguez et al., 2019). In the Iberian Peninsula, for instance, it is very common to find open forests, especially those dominated by *Quercus* species such as *Quercus ilex* or *Quercus suber*, for livestock use (Ayánz, 1994; Pulido et al., 2010). These open woodlands, called “dehesas”, have been greatly affected by climate change and pathogen attacks during the last decades (Lloret et al., 2004; Corcobado et al., 2013b; Corcobado et al., 2014; Rodríguez et al., 2017; Hereş et al., 2018), having experienced very pronounced dieback processes in the southwestern part of the peninsula (Avila et al., 2016; Gómez-Aparicio et al., 2017; Gallardo et al., 2019). In these open woodlands once the tree dies, it would be expected that the demography and biomass of certain fungal guilds, e.g. ectomycorrhiza from the tree or the population of saprotrophs specialized in digestion of woody tissue, would be negatively affected, also because cattle are actively preventing the natural regeneration of the trees (Zamora et al., 2001; López-Sánchez et al., 2014). On the other hand, in a system mainly dominated by annual and perennial grasses, it is expected that diversity and structure of bacterial communities will be strongly linked to the grass compartment, and hence less affected by tree mortality. Understanding how forest management may modulate the capacity of functional and structural recovery of soil microbial communities to an event of tree mortality may help us also sizing the magnitude and the severity of the potential perturbation of the system associated with climate-change induced tree mortality.

## CAPÍTULO 3

The aim of this study was to assess how forest management/use may modulate the response of soil microbial communities (diversity and composition) to episodes of climate-change induced tree mortality. We conducted a study to compare these responses between sites with high density of overstory trees (forests) versus sites where forest have been transformed into open woodlands for livestock use (dehesas). We also included a third category that includes sites previously used as dehesas that has been abandoned (open woodland) that are characterized by having an understory dominated by shrubs and seedlings. We used high-throughput sequencing technologies to make DNA metabarcoding from soil bacterial and fungal communities. To understand the effect of *Quercus ilex* decline in each ecosystem, at each studied stand, sampling was conducted under trees with different health status (healthy, affected and dead holm oaks), as well as in soils under no tree influence. Based on previous bibliography, we hypothesize that i) the diversity and composition of soil bacteria will change in natural (forests) with tree defoliation while in managed (dehesas) and open woodland ecosystems would remained more stable, ii) soil fungal communities would be more affected by Holm oak decline in managed ecosystems due to cattle and nutrient availability.

### Material and methods

#### Study area

We selected 13 locations across the Iberian Peninsula following two criteria: (1) locations where Holm oaks (*Quercus ilex* subs. *ballota*) have experienced symptoms of decline (e.g. defoliation) in the last decade (Lloret et al., 2004; MAGRAMA, 2007; Corcobado et al., 2013a; Camarero et al., 2014); and (2) locations where Holm-oaks are subjected to a land-use representative of the Iberian landscape. We selected three categories of land-use: two contrasting ecosystems (forest and dehesas), and a transitional woodland (open woodland) resulting from the abandonment and/or the change of use from dehesas (e.g. hunting or logging). To extend the information about the study area used in this chapter, please go to pages 31- 33.

#### Experimental design and soil sampling

The information related to the experimental design and soil samples can be found on pages 34 - 38. As a brief summary, for each location, we took soil samples under, and away (out the crown projection over soil) from, *Q. ilex*'s influence. To study the

effect of Holm oak's decline in soil microbial communities, we selected trees with three different health status based on the defoliation level of their canopies: healthy trees (defoliation level up to 25%), affected trees (defoliation level from 25 % to 99 %) and dead trees (defoliation level of 100 %) (Rodríguez et al., 2017; Hereş et al., 2018).

### **Soil biogeochemical variables**

For this chapter, we used only the information related to pH, SOC and mineral N. The methodology can be found on page 38.

### **DNA extraction and Illumina data processing**

We extracted soil DNA from each soil sample using PowerSoil DNA Isolation kit (MoBio, Laboratories, Inc) (Pages 43 - 45). After that, we submitted our samples to the Research Technology Support Facility (RTSF) at Michigan State University (MSU) to analyze the metabarcoding of bacterial and fungal communities (extended information can be found on pages 45 - 46). Once the DNA samples were analyzed, we performed a bioinformatic analysis (pages 46 - 51) using the platform Qiime 1.9.1 (Caporaso et al., 2010).

### **Statistical analyses**

We used R v.3.5.1 (R Core Team, 2016) to perform the statistical analysis of bacterial and fungal communities among each land-use, and within them, for each defoliation degree and bulk soil. We imported and cleaned the microbial data with the package phyloseq [v. 1.24.2; McMurdie and Holmes (2013)]. We filtered the data using the conservative threshold (0.005% of total sequences) recommended by Bokulich et al. (2013). Furthermore, we used rarefaction curves to check the quality of our sampling method, removing all samples that did not reach asymptote. Once we filtered the datasets, we calculated the alpha-diversity with Shannon (H') and Simpson's reciprocal (1/D) indices as a measure of diversity and Pielous' index (J') as evenness. We rarefied the data to calculate the beta-diversity, using phyloseq package to estimate the weighted UniFrac and Bray distances for bacteria and fungi, respectively. To visualize the beta-diversity, we plotted a Non-metric Multidimensional Scaling (NMDS) with the *metaMDS* function and performed a permutational test to check the homogeneity of multivariate dispersion with *betadisper* function, both from vegan package [v. 2.5-4; Oksanen et al. (2019)]. As the permutational test didn't show any difference in the dispersion of the samples, we performed a permutational ANOVA

(PERMANOVA) using the *adonis* function from the *vegan* package. Since our study presented a nested experimental design (13 different sites and several treatments), we used the option *strata = site* included in the *adonis* function, which allows the analysis of this type of nestedness. To explain the differences showed in the PERMANOVA analyses, we calculated the relative abundance to phylum level for each defoliation degree and bulk soil of our land-uses. Moreover, we complemented the relative abundance graphics with a mixed effect model for each phylum, using site as a random parameter. For the detection of indicator species, we used the indicator value [IndVal, Dufrêne and Legendre (1997)] using the *indval* function from the *labsv* package [v. 1.8-0; (Roberts, 2007)].

## Results

### Land-use effects over soil environment

We obtained the average soil pH, SOC and soil mineral nitrogen for each land-use category (Table 14). Forests and open woodlands showed similar soil pHs, ranging from 6.70 in forest to 7.01 units in open woodlands, and mineral N. However, in dehesas, we observed a significantly lower soil pH, with more acidic soils (5.58 units). Values of mineral N were, on the other hand, higher in dehesas than in forests and open woodlands. On the other hand, SOC remained highly unaltered in both extremes of our land-use gradient, increasing their values in open woodlands.

**Table 14.** Environmental variables for each land-use. The letter represents significant differences among land-use for each soil variable. pH = Soil pH; SOC = Soil Organic Carbon; Mineral N = Soil Mineral Nitrogen

Land-use	pH	SOC	Mineral N
Forest	6.70 (0.14) A	2.47 (0.11) A	254.80 (14.99) A
Open Woodland	7.01 (0.08) A	3.32 (0.19) B	274.21 (13.99) A
Dehesa	5.58 (0.07) B	2.39 (0.10) A	323.06 (10.45) B

### General characteristics of Illumina datasets and alpha-diversity indices

We obtained a total of 3,607,958 and 4,968,402 raw reads for bacterial and fungal sequences, respectively; which after the filtering and removal of low represented OTUs (see above), it resulted in 2,063,572 and 3,953,106 sequences for each bacterial and fungal community, respectively. From theses trimmed sequences, we obtained 2,203 OTUs for bacteria and 1,661 OTUs for fungi. Good's coverage values ranged from 80.1%

to 93.6% for bacterial samples and 96.7% to 99.9% for fungal samples, showing that both communities were well characterized. Alpha-diversity measured by Shannon, inverse Simpson and Pielous' indices showed no differences in richness and diversity of soil microbiota among land-uses (Table 15), or defoliation degree (including also soils under no tree influence; Table 19). Alpha-diversity of soil bacterial communities was significantly higher in dehesas soils than in soils from the other two land-use categories ( $H'_{forest} = 6.05$ ,  $H'_{dehesa} = 6.23$ ,  $H'_{open\ woodland} = 6.08$ ,  $P < 0.001$ ), whilst fungal communities were no significantly different among land-use categories ( $H'_{forest} = 3.79$ ,  $H'_{dehesa} = 3.64$ ,  $H'_{open\ woodland} = 3.89$ ,  $P < 0.10$ ). Within these land-uses, soil microbial communities under dehesas were the only one affected by defoliation, at some extent (Table 19).

**Table 15.** Alpha-diversity of bacterial and fungal communities among land-uses.  $H'$  = Shannon index,  $1/D$ : Simpson index,  $J'$  = Pielou's index. Different letters mean statistically ( $p$ -value  $< 0.05$ ) significant differences between different land-uses.

Soil microbial community	Index	Land-use		
		Forest	Open woodland	Dehesa
Bacterias	$H'$	6.05 (A)	6.08 (A)	6.23 (B)
	$1/D$	149.87 (A)	164.10 (B)	187.71 (C)
	$J'$	0.85 (A)	0.85 (A)	0.86 (B)
Fungi	$H'$	3.79 (A)	3.89 (A)	3.64 (A)
	$1/D$	25.29 (A)	20.73 (A)	23.34 (A)
	$J'$	0.71 (A)	0.68 (A)	0.69 (A)

### Beta-diversity analyses

We did not observe any difference in the multivariate dispersion of the weighted UniFrac (wUniFrac) and Bray distance from bacteria and fungi. However, NMDS separating the data in land-use categories showed different soil microbial composition in dehesas with respect to forest and open woodland (Figure 20). The analysis of beta-diversity within each land-use showed a homogeneous dispersion of the samples too, but different centroids among defoliation degrees, including soils collected under no tree influence. PERMANOVA analyses showed that bacterial community composition was affected the most by defoliation degree under forest and open woodlands. In forest, bacterial communities under healthy trees were different that those under defoliated and dead trees while in open woodlands, bacterial communities under dead trees were different that those found under "living trees" (healthy and defoliated) (Table 16 & 17). On the other hand, bacterial community composition did not show any sensitivity to tree defoliation under dehesas, whatsoever. Nevertheless, in all three



### CAPÍTULO 3

land-uses, the presence of the tree influenced soil bacterial and fungal community structure, as evidenced in the significant differences found between soils under trees and out of the tree influence (Tables 16 & 17).

Regarding fungal communities, the PERMANOVA analyses yielded opposite results to those obtained for bacteria (Tables 16 & 17). Under forests and open woodlands, the composition of the fungal communities was not sensitive to the tree defoliation degree, while under dehesas fungal communities suffered strong changes in composition when tree start to defoliate (Tables 16 & 17).

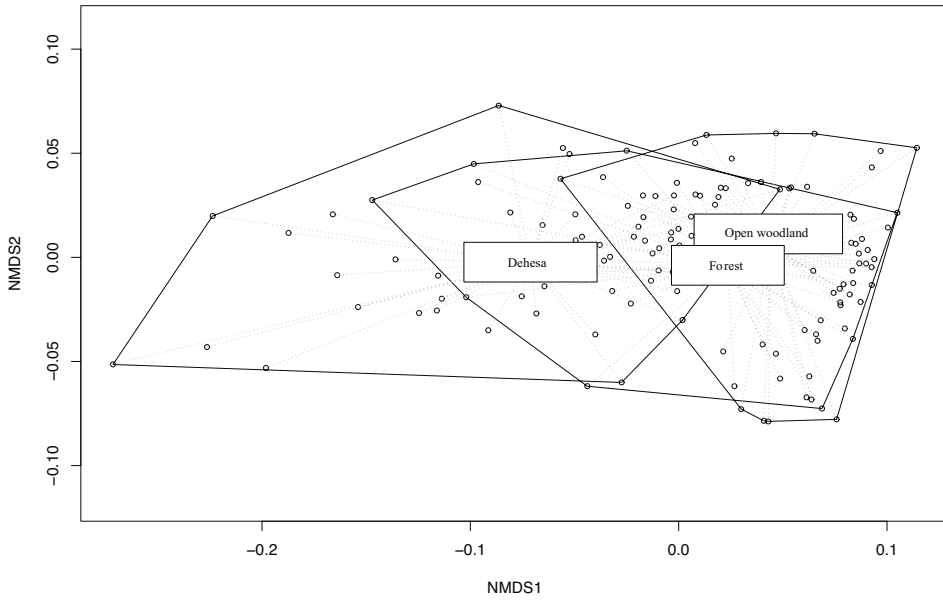
**Table 16.** PERMANOVA analyses of soil microbial communities (bacteria and fungi) comparing the composition from the different defoliation degrees and bulk soil within each land-use. Asterisks (\*) represents statistically significant differences with p-values < 0.05, and dots (.) represent marginal differences.

Land-use	Level	Bacteria		Fungi	
		F	P	F	P
Forest	Healthy vs Affected	0.81	0.015*	0.70	0.53
	Healthy vs Dead	0.74	0.037*	0.72	0.47
	Affected vs Dead	0.26	0.89	0.71	0.49
	Bulk soil vs Healthy	2.18	0.001*	1.54	0.001*
	Bulk soil vs Affected	1.26	0.004*	1.36	0.006*
Open woodland	Bulk soil vs Dead	1.18	0.001*	1.55	0.001*
	Healthy vs Affected	0.36	0.77	0.68	0.88
	Healthy vs Dead	0.84	0.019*	0.97	0.06
	Affected vs Dead	0.65	0.039*	0.81	0.28
	Bulk soil vs Healthy	3.21	0.001*	2.01	0.001*
Dehesa	Bulk soil vs Affected	2.79	0.001*	1.84	0.001*
	Bulk soil vs Dead	2.08	0.001*	1.90	0.001*
	Healthy vs Affected	0.62	0.63	1.03	0.022*
	Healthy vs Dead	0.96	0.14	1.08	0.018*
	Affected vs Dead	0.41	0.85	0.61	0.97
	Bulk soil vs Healthy	9.21	0.001*	3.10	0.001*
	Bulk soil vs Affected	7.80	0.001*	3.22	0.001*
	Bulk soil vs Dead	7.27	0.001*	2.99	0.001*

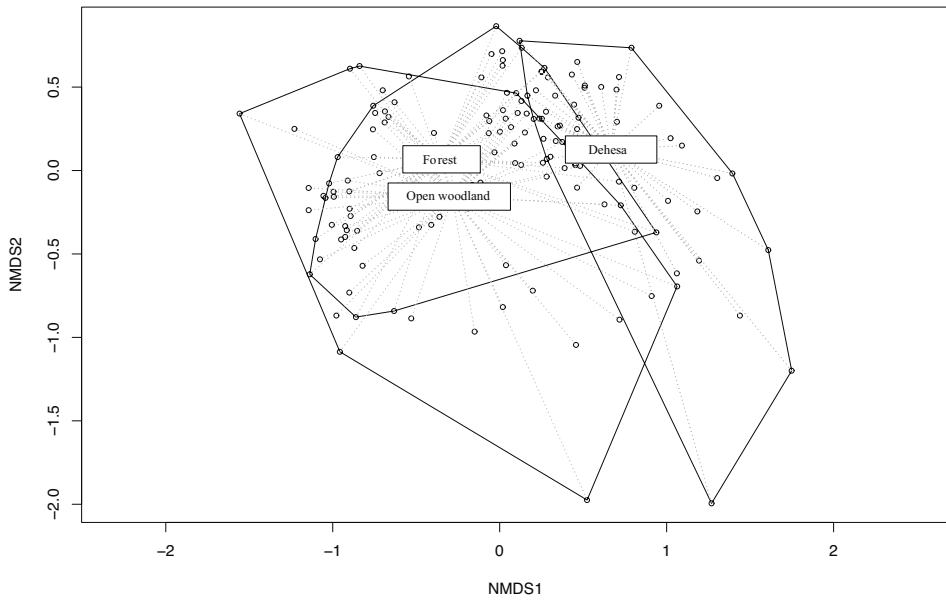
**Table 17.** PERMANOVA results of soil microbial communities (bacteria and fungi) comparing the composition from different defoliation degrees and bulk soil within each land-use. Different letters mean statistically ( $p$ -value < 0.05) significant differences between tree health and/or bulk soil.

Soil microbial community	Land-use	Tree health			Bulk soil
		Healthy	Affected	Dead	
Bacteria	Forest	A	B	B	C
Bacteria	Open woodland	A	A	B	C
Bacteria	Dehesa	A	A	A	B
Fungi	Forest	A	A	A	B
Fungi	Open woodland	A	AB	B	C
Fungi	Dehesa	A	B	B	C

A)



B)

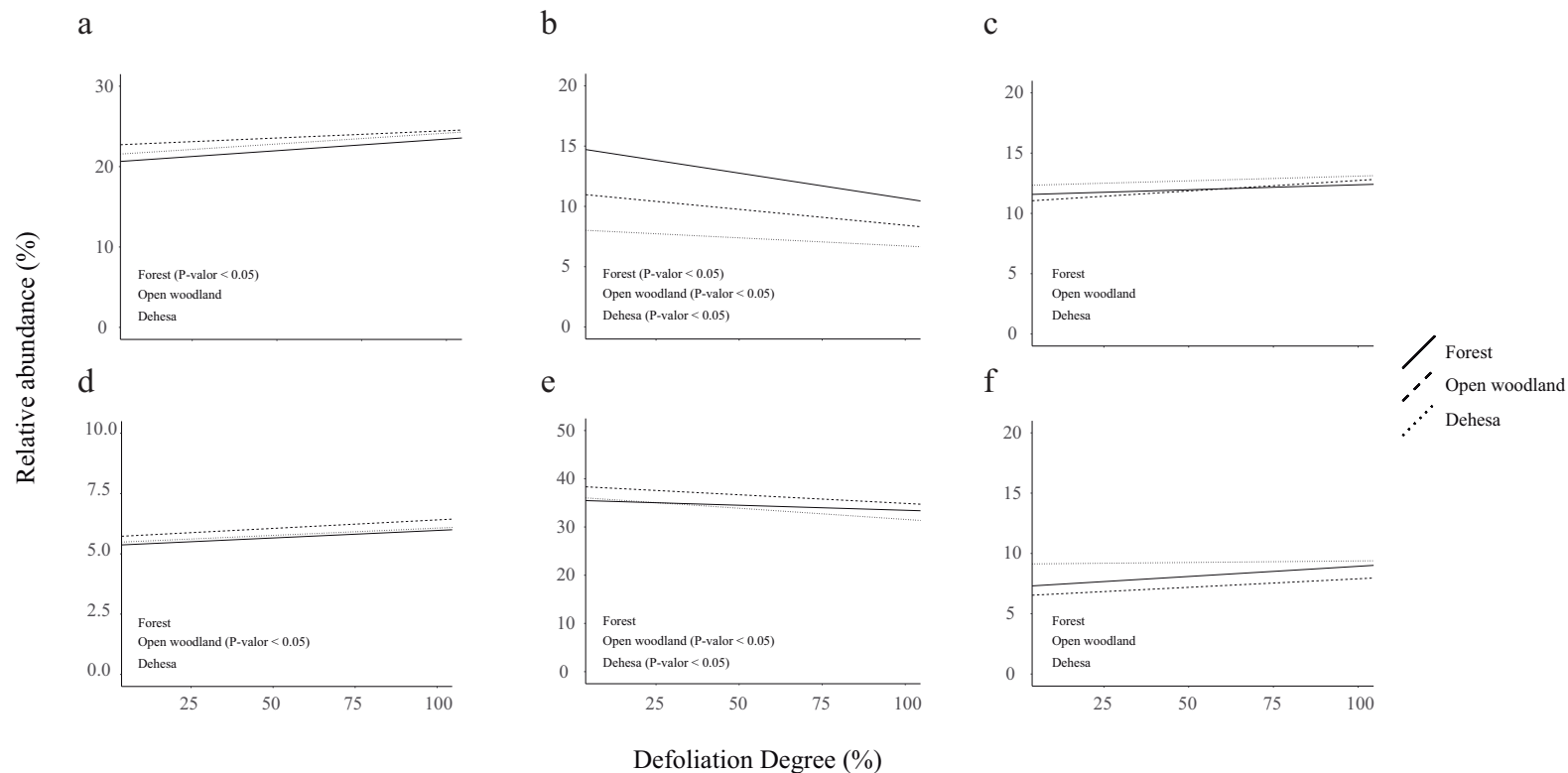


**Figure 20.** Non-metric multidimensional scaling (NMDS) of; A) bacteria with the wUniFrac distance; B) fungi with Bray distance; among land-uses.

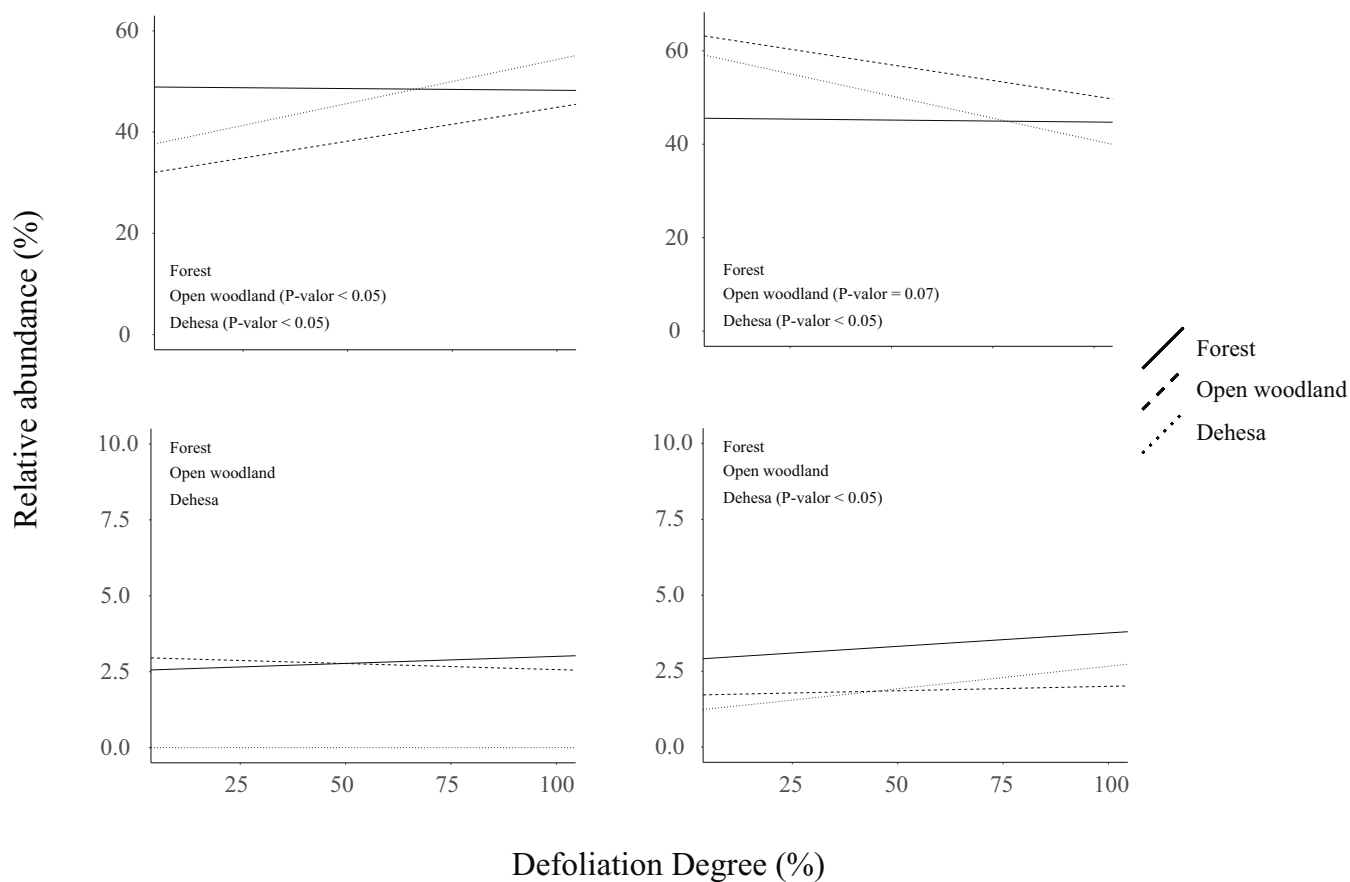
### **Soil bacterial and fungal composition**

The changes in the relative abundance at phylum level with defoliation degree, together with the mixed effect model obtained for each phylum (Figures 21 & 22), showed the alterations in the microbial composition associated with defoliation also observed by the NMDS (Figure 23). In all land-uses, the most representatives' phyla for bacteria, with more than 90% of their relative abundance, were Acidobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Planctomycetes, Proteobacteria and Verrucomicrobia; while in fungi, were Ascomycota and Basidiomycota. Mixed effect models showed the significant differences of these phyla based on its defoliation degree (Figure 21 & 22). Acidobacteria and Actinobacteria significantly increased and decreased, respectively, with defoliation degree in forest ecosystems (Figures 21a & 21b); while in dehesa and open woodland, Actinobacteria and Proteobacteria significantly decreased in their relative abundance with defoliation (Figures 21b & 21e). Besides, Verrucomicrobia did not show any whatsoever, though it showed not-significant positive trends with tree defoliation in forest and open woodland (Figures 21f). The relative abundance from the different phyla in soils under no tree influence was in general following the trend observed with Holm oak decline, i.e. values of abundances were closer to those found under dead trees, with Acidobacteria and Verrucomicrobia increasing, and Actinobacteria and Proteobacteria decreasing with respect to living trees (Figure 23).

The relative abundance of the most abundant fungal phyla did not show any sensitivity to defoliation under forest ecosystems (Figure 22). Under dehesas and open woodlands, however, Ascomycota and Basidiomycota presented a significant ( $p$ -value  $< 0.05$ ) increased and decreased with defoliation, respectively, being this trend specially marked under dehesas (Figures 22a & 22b). As in bacteria, soils under no-tree influence followed the defoliation trend, with abundances more similar to that under dead than under living trees (Figure 23).



**Figure 21.** Mixed effect models of bacterial relative abundance according to holm oak defoliation among land-uses (Forests: solid line; Open woodlands: dashed line; Dehesas: dotted line). Locations were used as random effect. a) Acidobacteria; b) Actinobacteria; c) Bacteroidetes; d) Planctomycetes; e) Proteobacteria; f) Verrucomicrobia.



**Figure 22.** Mixed effect models of fungal relative abundance according to holm oak defoliation among land-uses. Locations were used as random effect. A) Ascomycota; B) Basidiomycota; C) Mortierellomycota; D) Mucoromycota.

### Indicator species of each land-use

The values calculated by the IndVal index showed that dehesas presented more bacterial and fungal species than the rest land-uses (Table 18). These results were more evident in bacterial communities, with an IndVal of 27.42%; while in fungi was only a 3.60%. We also calculated the IndVal index associated with tree defoliation within each land-use, observing results similar in all of them for bacteria and fungi (Table 20). In all cases, the absence of tree influence increased the number of indicator/unique species, and this trend was especially marked under dehesas.

**Table 18.** Indicator species for bacteria and fungi in each land-use, represented by the Indicator value (IndVal).

Soil microbial community	Land-use		
	Forest (%)	Open Woodland (%)	Dehesa (%)
Bacteria	8.12	13.25	27.42
Fungi	1.46	0.73	3.60

### Discussion

We investigated here the alpha and beta diversity of soil bacterial communities as a means of understanding the capacity of soil biota under holm-oaks stands to absorb a perturbation and/or their capacity to recover after a perturbation (resilience) such as that caused by anthropic effects (land-use) or climate change induced tree mortality. Intensive transformation of natural forests in the Mediterranean area into open woodlands, intensively used for livestock (dehesas) causes, as expected, large changes in the diversity and composition of soil microbial communities (de Carvalho et al., 2016; Flores-Rentería et al., 2016; Petersen et al., 2019). This anthropic transformation of the forest into savanna-like ecosystems negatively affected especially saprophytic, mycelial-formers phyla, such as Actinobacteria and fungi from the Ascomycota and Basidiomycota phyla, which also represent the majority of the ectomycorrhizal fungi (Landeweert et al., 2001; Tedersoo et al., 2010; Tedersoo and Smith, 2013). On the other hand, it affected positively to prokaryotic phyla more associated with copiotroph environments, such as Proteobacteria (Pascault et al., 2013; Goberna et al., 2016; Yan et al., 2018) and other phyla like Acidobacteria, which further resulted in an increase in alpha diversity of prokaryotes with respect to forests and open woodlands. Hence, this anthropic transformation of forest into dehesa reflected a logical functional change towards a soil community less specialized in oxidation of carbon and tree symbiotic

## CAPÍTULO 3

relations, but more diverse, probably because the increase in plant alpha and beta diversity (Hiiesalu et al., 2014; Prober et al., 2015) and the input of nutrients from grazing animals (specially N and P) (Herridge et al., 2008; Gómez-Rey et al., 2012) that creates new niches in contrast with under the influence of trees. This new niches favors the predominance of some phyla (de Carvalho et al., 2016; Petersen et al., 2019) since tree coverage alleviates the environmental effect of sun and wind exposure (Pimentel and Kounang, 1998); while serves as a C source (Blagodatskaya and Kuzyakov, 2008). On the other hand, the recovery of the composition and diversity of soil microbial communities observed after abandonment of decades of intensive use in old-dehesas evidences the strong resilience of these systems to a long-term perturbation, evidencing the capacity of soil natural systems to recover. For instance, Zornoza et al. (2009) observed an increase in microbial biomass and richness with the abandonment of agricultural soils supporting their hypotheses of soil recovery, while Holtkamp et al. (2008) found that land abandonment is going to facilitate the slow recovery of above and belowground communities.

It is also possible that differences in pH between dehesas and forest/open woodlands may also explain part of the observed trends, since it is well known that pH is the best predictor of structure and diversity of soil microbial diversity (Fierer and Jackson, 2006; Lauber et al., 2009; Rousk et al., 2009). The observed tendencies, however, indicate the opposite of what it would be expected, since acidic pH is usually affecting negatively the soil bacterial diversity (Fernández-Calviño and Bååth, 2010; Tripathi et al., 2018) and generally favors fungal communities, which are more tolerant to acidic conditions (Rousk et al., 2010).

### **Land management determines the response and resilience of soil microbial communities after tree decline**

The observed shifts in the alpha and beta diversity, as well as in the relative presence of the most abundant prokaryote and fungal phyla, suggest that tree defoliation and mortality have the capacity to transform the belowground environment, triggering a process of ecological succession, as has been observed in the aboveground environment in previous studies (Lloret et al., 2004; Barba et al., 2013; Gazol et al., 2018b). However, we here show how the degree of anthropic transformation of the forest had a very strong impact on the response of the soil microbiota to the environmental perturbations caused by tree decline and subsequent

death (Curiel Yuste et al., 2012; Rodríguez et al., 2017; García-Angulo et al., submitted). Overall, our results support our hypothesis and shows how under denser stands microbial communities are more resilient and able to absorb perturbations associated with tree mortality more efficiently than systems where overstorey cover is less dense. This trend was especially reflected in the observed resilience of fungal communities under forest, i.e. tree mortality did not have any effect over abundance or alpha and beta diversity of fungal communities, whatsoever. Under less denser canopies (open woodlands and dehesas) soil fungal communities underwent large changes associated with tree decline: a decrease in relative abundance of Basidiomycota, to which most of the ectomycorrhizal fungi belong (Tedersoo et al., 2010; Sato et al., 2015) and an increase in Ascomycota, which is a phylum dominated by saprophytic organisms specialized in degrading long-chained structural organic compounds (e.g. lignin, celluloses and hemicelluloses) and recalcitrant organic matter in general (Voříšková and Baldrian, 2013; Hudson et al., 2015; Janusz et al., 2017). Hence, under less dense stands tree defoliation and mortality is pushing soil fungal communities towards a more saprophytic and less symbiotic-like functioning. The observed decrease with defoliation in the presence of the most abundant prokaryotic phylum, Proteobacteria, clearly suggest that under less dense systems (open woodlands and dehesas) there is a strong trend towards a less copiotroph soil environment (Pascual et al., 2013; Goberna et al., 2016; Yan et al., 2018), dominated by microbiota specialized in degradation of more recalcitrant SOM (e.g. Ascomycota). This is because tree defoliation and subsequent mortality limits the supply of substrate in the form of labile carbohydrates (exudates or rhizodeposition) demanded by more copiotrophic organisms (e.g. Proteobacteria), symbionts (e.g. mycorrhiza), and other soil rhizospheric communities (e.g. Högberg et al. (2001); Binkley et al. (2006); Barba et al. (2016b); Curiel Yuste et al. (2019)). As expected, therefore, tree defoliation and mortality under less dense overstorey systems was associated with cascading causal-effect relations causing substantial changes in the biological functioning, diversity and taxonomic composition of the soil system (Avila et al., 2016; Rodríguez et al., 2017; Flores-Rentería et al., 2018; Rodríguez et al., 2019) bringing the systems to new equilibriums dominated by microbiota associated with understory vegetation (e.g. grasslands, (Evans et al., 2017; García-Angulo et al., submitted)). This is further supported by the fact that in less dense canopies, soil microbial communities under dead trees resembled those observed in open areas where understory vegetation (grass and shrubs) dominates. Our results coincide with the functional resilience



## CAPÍTULO 3

generally observed under denser forest stands after episodes of tree mortality (e.g. Nave et al. (2011); Barba et al. (2016a); Curiel Yuste et al. (2019); Rodríguez-Calcerrada et al. (2019)) in contrasts with results obtained in open, more transformed, woodlands (e.g. Gómez-Aparicio et al. (2008); Gómez-Aparicio et al. (2012); Lloret et al. (2015); Rodríguez et al. (2017); Rodríguez-Calcerrada et al. (2019)) where tree mortality results in large soil stoichiometry imbalances also associated with large changes in the ecology and functioning of soil microbial communities.

We, therefore, hypothesize that stand tree density determines the resiliency of the soil system to a climate change driven episode of forest dieback. Density of the tree determines density of root system and rhizospheric related microbiota (e.g. hyphal networks) that maintains the communication and functioning of the system and allows a fast-functional recovery of the system after episodes of tree mortality in forest systems (Van Der Heijden and Horton, 2009; Barto et al., 2012; Simard et al., 2012). Given all these new insights on soil ecology and its role in forest functioning, there are opportunities to improve forest management plans oriented to maintain the health of the soil microbiota and, therefore, of the forest under scenarios of climate change.

## Conclusions

In this chapter, we found out that the abandonment of highly managed land-uses (dehesas) and subsequent spontaneous tree establishment forming open woodland structures, was associated with the recovery of states of soil microbial communities similar to those found in forests. Furthermore, in the most managed ecosystems the bacterial community remained highly unaltered, suggesting the presence of different soil niches apart from the ones formed by trees due to the high colonization of the herbaceous layer and/or the presence of grazing animals. On the other hand, in more dense ecosystems (forests) the fungal community showed high resilience to tree defoliation, indicating a better capacity of the system to recovery after this perturbation, since a more established mycorrhizal network will promote the regeneration of trees. Nonetheless, for all our land-use gradient, soil microbial communities, bacteria and fungi, showed a parallelism in the structure and abundance among the soil microorganisms found far from tree influence and the trends followed when tree defoliates and died, suggesting that soil microbial communities may lose their capacity to recovery to these perturbations and change to new equilibriums, like the ones presented in savannah-like ecosystems.

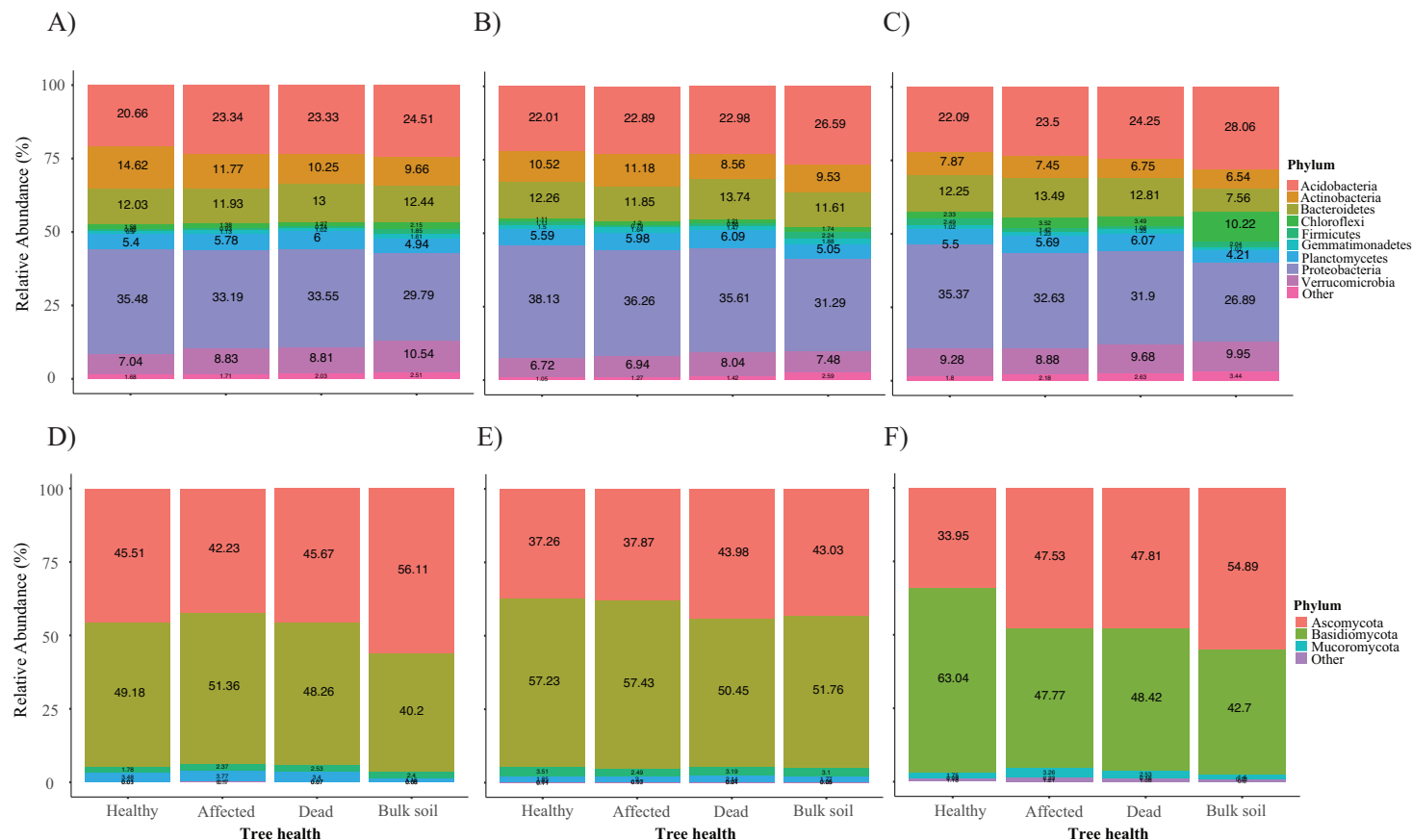
## Supplementary material

**Table 19.** Alpha-diversity of bacteria and fungi at defoliation degree and bulk soil from each land-use.  $H'$  = Shannon index,  $1/D$ : Simpson index,  $J'$  = Pielou's index. Different letters mean statistically ( $p$ -value < 0.05) significant differences between tree health and/or bulk soil.

Soil microbial community	Land-use	Index	Tree influence			Bulk soil
			Healthy	Affected	Dead	
Bacteria	Forest	$H'$	6.06 (A)	6.06 (A)	6.09 (A)	6.00 (A)
		$1/D$	146.18 (A)	147.56 (A)	164.45 (A)	140.99 (A)
		$J'$	0.85 (A)	0.85 (A)	0.85 (A)	0.85 (A)
	Open woodland	$H'$	6.10 (A)	6.07 (A)	6.08 (A)	6.04 (A)
		$1/D$	167.80 (A)	163.52 (A)	166.15 (A)	159.15 (A)
		$J'$	0.85 (A)	0.85 (A)	0.85 (A)	0.85 (A)
	Dehesa	$H'$	6.28 (A)	6.31 (A)	6.29 (A)	6.01 (B)
		$1/D$	183.42 (AB)	202.24 (A)	201.86 (A)	163.32 (B)
		$J'$	0.86 (AB)	0.87 (A)	0.87 (A)	0.85 (B)
Fungi	Forest	$H'$	3.85 (A)	3.97 (A)	3.83 (A)	3.91 (A)
		$1/D$	23.84 (A)	24.86 (A)	27.81 (A)	24.37 (A)
		$J'$	0.71 (A)	0.71 (A)	0.69 (A)	0.73 (A)
	Open woodland	$H'$	3.63 (A)	3.72 (A)	3.56 (A)	3.64 (A)
		$1/D$	21.28 (A)	22.80 (A)	18.85 (A)	19.89 (A)
		$J'$	0.67 (A)	0.70 (A)	0.67 (A)	0.69 (A)
	Dehesa	$H'$	3.63 (A)	4.13 (B)	3.77 (AB)	3.62 (A)
		$1/D$	18.87 (A)	31.67 (B)	23.12 (AB)	19.71 (A)
		$J'$	0.66 (A)	0.74 (B)	0.67 (AB)	0.69 (A)

**Table 20.** Indicator species for bacteria and fungi at each defoliation degree and bulk soil for each land-use, represented by the Indicator value (IndVal).

Soil microbial community	Land-use	Tree Influence (%)			Bulk soil
		Healthy	Affected	Dead	
Bacteria	Forest	1.51	0.50	0.78	3.71
	Open woodland	2.12	1.15	0.88	5.30
	Dehesa	3.71	2.13	1.57	11.49
Fungi	Forest	0.15	0.31	0.62	2.31
	Open woodland	0.36	0.14	0.29	3.21
	Dehesa	0.84	0.84	0.37	6.70



**Figure 23.** Relative abundance to phylum level for each land-use representing the differences among defoliation degrees and bulk soil. A) Relative abundance of bacterial communities in forests; B) Relative abundance of bacterial communities in open woodlands; C) Relative abundance of bacterial communities in dehesas; D) Relative abundance of fungal communities in forests; D) Relative abundance of fungal communities in open woodlands; E) Relative abundance of fungal communities in dehesas.

## **DISCUSIÓN GLOBAL**

## **El decaimiento del encinar produce un efecto cascada en los ciclos biogeoquímicos del suelo**

El decaimiento del encinar produce una alteración en los ciclos biogeoquímicos del suelo de los cuales la microbiota es altamente responsable. El efecto que causa el decaimiento en la estequiometría del suelo puede incluso oscurecer el impacto que tienen las variables climáticas en los ciclos biogeoquímicos del suelo. De este modo, la precipitación (MAP) mostró un papel relevante en el ciclado de nutrientes (ej.  $R_H$  y amonificación neta del N), lo que se debe a que una ausencia del agua limitará las capacidades de los microorganismos para realizar sus funciones de manera correcta (Pietramellara et al., 2002; Curiel Yuste et al., 2003; Curiel Yuste et al., 2007; Moyano et al., 2012; Sardans and Peñuelas, 2013; Jiao et al., 2016; Jeong et al., 2018). Sin embargo, nuestros resultados (capítulo 1) muestran que el efecto del decaimiento, que sigue una tendencia similar en todo nuestro gradiente de manejo histórico (bosques, dehesas y bosques abiertos), amplifica los potenciales efectos negativos que el clima puede tener sobre el funcionamiento del sistema suelo. De este modo, la defoliación y muerte de las encinas va a producir un efecto en cascada en las dinámicas nutricionales del suelo en ciclos tan importantes como el del C y N.

Es probable que en las primeras etapas del decaimiento (defoliación de la masa arbórea), la deposición de las hojas produzca un incremento de las fuentes de C que serán mineralizadas por los microorganismos copiotrofos (Kaňa et al., 2013; Curiel Yuste et al., 2019). Sin embargo, una vez que el árbol muera, el C proveniente de sus hojas se reducirá, a la vez que se detendrá el aporte de C lábil por parte de sus raíces (Kuz'yakov, 2002; Blagodatskaya and Kuz'yakov, 2008; Štursová et al., 2014). Este proceso afectará de manera negativa a la mineralización del C y N del suelo, altamente representados por la respiración heterotrófica (mineralización del C a  $CO_2$ ) y la amonificación (descomposición de la MOS a amonio) (Capítulo 1). Esta disminución en la mineralización de los ciclos del C se debe a cambios en los aportes nutricionales (ej. reducción de C lábil y aumento de C recalcitrante) y/o alteraciones de las comunidades microbianas del suelo (ej. disminución de microorganismos copiotrofos).

Sin embargo, el proceso de defoliación y muerte del árbol mostró un efecto mucho más acentuado sobre el ciclo del N. Este impacto se había observado en estudios anteriores, donde la defoliación y muerte del árbol se asoció con el aumento del N mineral del suelo (Jenkins et al., 1999; Griffin et al., 2011; Xiong et al., 2011; Edburg et

## DISCUSIÓN GLOBAL

al., 2012; Avila et al., 2016; Rodríguez et al., 2017). No obstante, en esta tesis hemos profundizado en su estudio, observando como este proceso de defoliación se asocia a una disminución de la amonificación asociado, a su vez, a un aumento en la abundancia de ciertos microorganismos encargados de oxidar el amonio a nitrato (nitroprocariotas), favoreciendo el proceso de nitrificación (Capítulo 1). Este aumento de la nitrificación se traducirá en un incremento en el nitrato disponible del suelo, el cual se acumulará en el suelo debido a la muerte del sustrato arbóreo, pudiendo favorecer el establecimiento de sustrato herbáceo. Asimismo, no sólo la cantidad de nitrato se ve incrementada con el decaimiento, ya que otros nutrientes móviles, como el fósforo disponible, aumentan su concentración cuando el árbol muere. Estos resultados concuerdan con la disminución en la abundancia de los hongos ectomicorrícicos, capaces de absorber N y P hacia la planta, cuando la encina se ve afectada por el decaimiento.

Por tanto, nuestros resultados evidencian como el decaimiento del encinar puede tener una gran consecuencia a nivel global. Por una parte, la defoliación y muerte del arbolado va a cambiar la dinámica de C de los ecosistemas, produciendo que los sumideros de C pasen emitir una gran cantidad del C acumulado en forma de CO<sub>2</sub> y produciendo un incremento en los gases de efecto invernadero (Adams et al., 2010; Hicke et al., 2012). Del mismo modo, la muerte de la encina provocará la acumulación de N y P mineral en el suelo, el cual será eliminado del sistema mediante desnitrificación (emisión de N a la atmósfera) o lixiviación, lo que producirá la contaminación de acuíferos y/o ríos (Di and Cameron, 2002; Penuelas et al., 2009; Smolders et al., 2010).

### **El manejo histórico modula la diversidad y sensibilidad de las comunidades microbianas del suelo**

El manejo histórico fruto de la actividad antropogénica ha llevado a la formación de ecosistemas de encinares de uso silvopastoral, conocidos como dehesas, que ha conducido a una serie de cambios en el ecosistema suelo con respecto a los sistemas naturales de bosques naturales de quercíneas. En este sentido, la reversión de la antropización de los encinares hacia ecosistemas de bosques abiertos, similares a las sabanas, ha promovido alteraciones tanto en las comunidades microbianas del suelo (capítulos 2 y 3), como en los ciclos biogeoquímicos del suelo (capítulo 1) (Tárrega et al., 2009; Lopez-Sangil et al., 2011; Cuesta et al., 2012). Por ejemplo, la transformación

de los bosques a dehesas ha provocado una disminución en las fuentes de C que provienen del sustrato arbóreo debido a la disminución de la cubierta vegetal fruto del aclarado de las encinas en estos sistemas. De este modo, se puede pensar que las zonas abiertas que se forman van a recibir una menor cantidad de C al no existir un árbol que genere estos aportes de biomasa y nutrientes, lo que afectará negativamente a los microorganismos saprófitos, especialmente a aquellos capaces de formar una red micelial, como las especies bacterianas del filo Actinobacteria, o los hongos de los filos Ascomycota y Basidiomycota, viéndose afectadas, por tanto, los hongos ectomicorrícicos (Landeweert et al., 2001; Tedersoo et al., 2010; Tedersoo and Smith, 2013). Estos cambios en las dinámicas nutricionales van a provocar que las comunidades microbianas de las dehesas sean más diversas, debido a la mayor diversidad de especies herbáceas (Hiiesalu et al., 2014; Prober et al., 2015) y al aporte de N y P por los animales de pastoreo (Herridge et al., 2008; Gómez-Rey et al., 2012), frente a unas comunidades microbianas más especializadas en la mineralización de la materia orgánica, proveniente del sustrato arbóreo, que se puedan encontrar en los bosques.

Además de una clara diferencia en la composición taxonómica y diversidad de las comunidades microbianas, el núcleo de las comunidades microbiana del suelo, definida como los taxones más representativos de cada tipo de manejo, mostró patrones de sensibilidad diferentes para los distintos tipos de manejos históricos definidos en este estudio (bosques, bosques abiertos y dehesas; capítulo 2). Por un lado, las bacterias del suelo mostraron una mayor sensibilidad a las variables climáticas (MAT y MAP) y abióticas (pH y nutrientes) que los hongos. Esta resistencia de las comunidades fúngicas puede estar asociada con su capacidad para formar estructuras de resistencia, denominadas esporas, lo que les confiere una alta resiliencia frente a posibles perturbaciones ambientales (Picone, 2000; Violi et al., 2008); del mismo modo, también puede deberse a la asociación de las micorrizas con el sustrato vegetal, mediante la formación de redes de hifas bajo el suelo lo que les conferirá una mayor protección en un escenario de limitación de nutrientes o incluso en ambientes en los que se el agua sea limitante (e.g sequías) (Barto et al., 2012; Simard et al., 2012). Por otro lado, las comunidades bacterianas presentaron una alta sensibilidad al pH del suelo, siendo indiferente el tipo de ecosistema en el que se encontrasen. Este hecho concuerda con lo encontrado en diversos estudios que señalan que el pH del suelo es capaz de modificar la estructura y diversidad de las comunidades microbianas del suelo (Fierer and Jackson, 2006; Lauber et al., 2009; Rousk et al., 2010; Banerjee et al.,

## DISCUSIÓN GLOBAL

2016a; Delgado-Baquerizo et al., 2018). Sin embargo, las tendencias observadas en esta tesis indican patrones opuestos a los esperados (capítulos 2 y 3), ya que pH ácidos normalmente afectan de manera negativa a la diversidad bacteriana, en favor de las comunidades fúngicas, que son capaces de tolerar condiciones de acidez ambiental (Rousk et al., 2010; Grosso et al., 2016). En general, las comunidades bacterianas de los sistemas más transformados, las dehesas, son las comunidades más sensibles a los gradientes medioambientales del estudio, y especialmente muestran alta sensibilidad al clima (ej. MAT y MAP), así como a la influencia del sustrato arbóreo. Esta sensibilidad puede estar relacionada con la distribución que presentan las encinas en las dehesas, dado que las coberturas arbóreas densas (ej. bosques) tamponan las condiciones climáticas del suelo al interceptar radiación y viento, lo que permite cierto desacople respecto al clima (Barba et al., 2016a). Del mismo modo, la influencia de la encina va a generar un mayor aporte de C lábil a los microorganismos del suelo a través de exudados y aportes continuos de materia orgánica de tejidos muertos que producirá un cambio en su diversidad y/o abundancia, favoreciendo linajes más asociados a ambientes copiotróficos como el filo Proteobacteria. Debido principalmente a este efecto tamponador y este aumento en aporte de sustrato que presentan los bosques, el núcleo de la comunidad bacteriana y fúngica de los bosques permaneció altamente inalterado. La microbiota del suelo de bosques presentó sensibilidad solo por parte de algunos filos a algunos nutrientes esenciales del suelo, como el amonio y el fósforo disponible, que dada la mayor competición por estos recursos en doseles más cerrados, pasan a ser los factores limitantes. Esta sensibilidad, sin embargo, se hizo más marcada en las especies clave (*keystone*: taxones actúan como conectores o núcleos en la comunidad microbiana) de este ecosistema, modificando la abundancia de un gran número de especies de los filos Actinobacteria (e.g. OTU\_08: Familia *Nocardioidaceae* (Capítulo 2)) y Proteobacteria (e.g. OTU\_17: Familia *Bradyrhizobiaceae* (Capítulo 2)). Estos filos son altamente conocidos por su capacidad para degradar la MOS (Fierer et al., 2013), por lo que un cambio en estos nutrientes podría afectar a su capacidad para mineralizar correctamente el C del suelo.

### **El abandono de las dehesas favorece el restablecimiento de las comunidades microbianas encontradas en los ecosistemas naturales de bosques**

El abandono de las dehesas y/o el cambio de manejo (ej. coto de caza, extracción maderera, etc) promueve un proceso de sucesión secundaria que facilitará la regeneración natural de la dehesa hacia ecosistemas de tipo bosque (bosques abierto),



gracias a la regeneración del sustrato arbóreo (Díaz et al., 1997; Tárrega et al., 2009; Pulido et al., 2010). La recuperación y el nuevo establecimiento del sustrato arbóreo va a generar un proceso de cambio en la diversidad y estructura de las comunidades microbianas del suelo, favoreciendo la recuperación de comunidades microbianas similares a las encontradas en los bosques (capítulos 2 y 3). En este sentido, la recuperación del arbolado fomentará la adquisición de nuevas fuentes de C lábil procedentes de la materia muerta generada por los árboles (especialmente hojas y raíces) y/o de los exudados de las raíces. Este aumento en las formas de C de fácil descomposición generará un incremento de las bacterias copiotrofas, encargadas de descomponer la materia orgánica del suelo (ej. Actinobacterias y Proteobacterias) (Curiel Yuste et al., 2007; Pascault et al., 2013; Goberna et al., 2016). Del mismo modo, al aumentar la abundancia de estos filos, en paralelo disminuirá la abundancia de las especies del filo Verrucomicrobia, las cuales se asocian con la descomposición de un C más recalcitrante (Fierer et al., 2013; Banerjee et al., 2016a).

Estos patrones de regeneración de las comunidades microbianas del suelo en los bosques abiertos se encontraron de nuevo al observar las especies clave de los distintos manejos. Por ejemplo, las especies clave bacterianas de los bosques y los bosques abiertos presentaron cinco taxones similares, mientras que entre los bosques abiertos y las dehesas no se encontraron ninguno. Sin embargo, la estructura de las redes de coocurrencia conformadas alrededor de las especies clave de bacterias mostró que las comunidades bacterianas de bosque son todavía más estables y menos compartimentalizadas que las de los sistemas más transformados, a pesar del abandono y la regeneración. En este sentido, los bosques exhibieron 3 tipos diferentes de especies clave (núcleos locales, conectores y núcleos globales) mientras que los bosques abiertos y las dehesas presentaron sólo dos (conectores y núcleos globales). Esta estructura compartimentalizada en sistemas transformados (Joly et al., 2017) puede deberse a la mayor variabilidad espacial de estos sistemas con respecto a los bosques densos, con estructuras mucho más parcheadas donde la dominancia de herbáceas, matorrales y árboles se intercala. Por otro lado, la diversidad y abundancia de los hongos mostró unos patrones similares en todo nuestro gradiente de manejo, teniendo un 91 – 95 % de especies pertenecientes a los filos Ascomycota y Basidiomycota. Esta gran similitud encontrada en todos los manejos puede estar relacionada con la alta resiliencia de estas comunidades fúngicas a las perturbaciones ambientales o antropogénicas gracias a la formación de estructuras de resistencia (Picone, 2000; Violi et al., 2008) o a la formación de redes micorrícicas con el sustrato

## DISCUSIÓN GLOBAL

vegetal, lo que les proporciona una protección frente a ciertas perturbaciones (e.g. sequías, escasez de nutrientes) (Curiel Yuste et al., 2011; Barto et al., 2012; Simard et al., 2012). Sin embargo, al observar la estructura de las redes formada por las especies clave de los hongos se encontraron unos patrones más similares entre los bosques y los bosques abiertos, que entre estos y las dehesas. Estos patrones pueden estar asociados a un cambio en las estructuras fúngicas de las dehesas con su abandono, favoreciendo la regeneración de especies más abundantes en los ecosistemas de bosque.

Esta regeneración subterránea paralela al establecimiento del bosque encontrada con el abandono de las dehesas puede, sin embargo, verse afectada por el decaimiento del arbolado producido por el cambio climático (Corcobado et al., 2013b; de Sampaio e Paiva Camilo-Alves et al., 2013; Camarero et al., 2015; Gómez-Aparicio et al., 2017; Rodríguez-Calcerrada et al., 2019), que puede revertir este proceso natural de recuperación de la microbiota del suelo.

### **El manejo de los encinares modula las comunidades microbianas del suelo tras el fenómeno del decaimiento**

El decaimiento de las masas arbóreas, y particularmente de la encina, causa grandes pérdidas a nivel económico y de biodiversidad, pudiendo alterar tanto a las especies que se encuentran en la superficie del suelo (arbolado) como a las que se encuentran en la zona rizosférica (comunidades microbianas) (Curiel Yuste et al., 2012; de Sampaio e Paiva Camilo-Alves, 2013; Avila et al., 2016; Curiel Yuste et al., 2019). En este sentido, los resultados obtenidos al estudiar la diversidad alfa y beta de las comunidades microbianas del suelo sugieren que la defoliación y muerte de la encina tienen la capacidad de transformar el ecosistema suelo, llevando a cabo un proceso de sucesión ecológica que se refleja en cambios en las comunidades microbianas del suelo hacia otros equilibrios encontrados en las zonas de sotobosque (capítulo 3). Sin embargo, el manejo al que se encuentran sometidos estos encinares puede modular la respuesta de las comunidades microbianas frente al decaimiento y las perturbaciones asociadas a este. En nuestro estudio, hemos observado que las comunidades fúngicas de las masas forestales más densas (bosques) presentan una mayor resiliencia frente al decaimiento en comparación a los ecosistemas abiertos (dehesas y bosques abiertos), presentando valores de diversidad beta similar en los diferentes estados de salubridad de la encina, lo que nos sugiere que la mortalidad de

arbolado no está afectando a la distribución, presencia y proliferación de hongos en suelo. Esto puede deberse a la asociación entre los hongos micorrícicos del suelo con la encina a través de la red de hifas que se forma bajo el suelo, lo que facilita la absorción de nutrientes y agua, y permite una recuperación más eficaz tras los episodios de decaimiento (Brundrett, 2009; Richardson et al., 2009; Urcelay et al., 2009; Van Der Heijden and Horton, 2009; Barto et al., 2012; Simard et al., 2012; Tedersoo and Smith, 2013).

Por el contrario, los ecosistemas más transformados, con una menor densidad de arbolado, presentan una clara tendencia de disminución en la abundancia de las especies del filo Basidiomycota paralela a un aumento en abundancia de especies del filo Ascomycota. Este cambio en las abundancias de estos filos se traduce en una disminución de las especies ectomicorrícicas asociadas con el sustrato arbóreo y un incremento de las especies saprófitas, altamente especializadas en la degradación de C recalcitrante (ej. lignina y celulosa) (Voříšková and Baldrian, 2013; Hudson et al., 2015; Janusz et al., 2017). De nuevo, nuestros resultados muestran la enorme fragilidad de las comunidades microbianas en ecosistemas transformados, mucho más susceptibles a cambios estructurales grandes con enormes consecuencias funcionales para el sistema suelo.

El efecto del decaimiento sobre las comunidades bacterianas fue, en contraposición, mayor en ecosistemas con cobertura arbórea más densa, frente a la mayor resiliencia encontrada en los ecosistemas de dehesa y bosques abiertos. Este cambio en las comunidades bacterianas es probable que sea debido al menor aporte de C lábil por parte del sustrato arbóreo. La disminución de la salud del árbol afecta negativamente a la cantidad en el aporte de sustrato, así como a su calidad, ya que el decaimiento está asociado a una disminución en la aportación de sustrato lábil procedente de órganos más perecederos (hojas y raíces finas) y/o exudados de las raíces, lo que tiene la capacidad de generar un cambio en la diversidad y abundancia de las comunidades microbianas (Avila et al., 2016; Rodríguez et al., 2017; Flores-Rentería et al., 2018; Rodríguez et al., 2019). En este sentido, los filos encargados de la descomposición de la materia orgánica del suelo (ej. Actinobacteria y Proteobacteria) van a verse altamente reducidos, favoreciendo la colonización de otros microorganismos (ej. Acidobacterias). Estos cambios en la diversidad y abundancia de los principales filos con el decaimiento parecen seguir una tendencia similar a la encontrada en las zonas colonizadas por especies arbustivas y de herbáceas, lo que

## DISCUSIÓN GLOBAL

puede traducirse en la transformación de la microbiota del suelo hacia equilibrios más similares a los encontrados en las vegetaciones de sotobosque.

## **CONCLUSIONES GENERALES**

1. El decaimiento inducido por sequía en los encinares mediterráneos puede agravar los efectos directos del clima en los ciclos biogeoquímicos del suelo lo que supone una alteración de la funcionalidad de las comunidades microbianas encargadas de mineralizar la materia orgánica del suelo, disminuyendo la respiración heterotrófica del suelo, así como la amonificación del nitrógeno del suelo.
2. El decaimiento del encinar produce una cascada de relaciones causa-efecto que promueve cambios en la abundancia de grupos funcionales microbianos de gran importancia, como un aumento en la abundancia de bacterias nitrificadoras y una disminución de hongos ectomicorrízicos, resultando en un aumento de formas móviles del nitrógeno y fósforo no captado por el árbol y potencialmente lixiviable. Esto supone un cambio en la estequiometría del suelo que puede alterar tanto a las especies sobre el nivel del suelo como subterráneas y potencialmente contaminar otros ecosistemas produciendo el fenómeno de eutrofización.
3. El abandono de los ecosistemas de encina más manejados (dehesas) produce, en paralelo a la regeneración del sustrato arbóreo, una recuperación en el núcleo de las comunidades microbianas del suelo hacia una microbiota similar a la encontrada en los ecosistemas naturales de bosque.
4. La microbiota de los bosques formados tras el abandono de las dehesas (bosques abiertos) mostraron una comunidad dominada por bacterias copiotrofas (ej. Actinobacterias y Proteobacterias) y hongos saprotrófos (ej. Ascomycota). Estos cambios sugieren un aumento en el carbono del suelo proveniente principalmente de la generación de más material orgánico fruto de la proliferación de nuevas plántulas y matorral, así como de un aumento del carbono lábil proveniente de la rizodeposición y la deposición de materia orgánica.
5. El manejo histórico de los encinares modula la diversidad, estructura y sensibilidad del núcleo de las comunidades microbianas del suelo. De este modo, los ecosistemas más abiertos y manejados (dehesas) muestran una microbiota altamente sensible al clima; mientras que, en los ecosistemas más densos (bosques) mostraron una mayor sensibilidad a los nutrientes

## CONCLUSIONES GENERALES

limitantes (ej. amonio y fósforo disponible), sugiriendo una alta repercusión de la distribución de la masa vegetal en el núcleo de las comunidades microbianas del suelo.

6. El efecto modulador del manejo histórico de los encinares sobre el decaimiento forestal muestra la alta resiliencia que tiene la microbiota del suelo (bacterias y hongos) para tolerar las perturbaciones producidas por el cambio climático.
7. El manejo histórico de los encinares mediterráneos modula los efectos producidos por el decaimiento inducido por la sequía en las comunidades bacterianas y fúngicas del suelo, reflejado en que en los sistemas más manejados los efectos sobre las comunidades fúngicas son más severos, a la vez que presentan una comunidad bacteriana más resiliente, asociada a unos ecosistemas con predominancia de sustrato herbáceo.
8. La alta resiliencia mostrada por las comunidades fúngicas en los ecosistemas de bosque sugiere una rápida regeneración del sistema una vez la perturbación desaparece; sin embargo, los ecosistemas más manejados de dehesas presentaron una comunidad fúngica menos resiliente, estando dominadas por organismos saprotrofos especializados en la descomposición de fuentes de carbono recalcitrante (ej. Ascomycota).
9. En sistemas más abiertos y manejados, el paralelismo encontrado entre la estructura y abundancia de las comunidades microbianas fuera de la influencia del árbol con las tendencias seguidas por las comunidades microbianas cuando el árbol se defolia y muere sugiere que el decaimiento tiene un efecto en las comunidades microbianas del suelo similar al encontrado en la parte aérea del ecosistema, perdiendo su capacidad de resiliencia y moviéndose hacia nuevos estados de equilibrio. En estos nuevos estados aparecen comunidades microbianas, taxonómica y funcionalmente, más asociadas con las especies de herbáceas y sotobosque.

## **GENERAL CONCLUSIONS**



1. Drought – induced decline in Mediterranean Holm oak might exacerbated the direct effects of climate on soil biogeochemical cycles, which suggest an alteration in the functioning of soil microbial communities to degrade soil organic matter, decreasing soil heterotrophic respiration and soil ammonification.
2. Holm oak defoliation triggers a cascade of causal-effects relations that promotes changes in the abundance of some important microbial functional groups, such as an increase in the abundance of nitrifying bacteria and a decrease in ectomycorrhizal fungi, resulting in increases of some mobile forms of nitrogen and phosphorus not captured by the tree and to potentially leachable. This implies a change in the stoichiometry of the soil that might alter the above and belowground species and potentially contaminate other ecosystems through eutrophication.
3. The abandonment of most intensively managed Holm oak ecosystems (dehesas) produced, in parallel to tree regeneration, the recovery of soil microbial communities towards a microbiome similar to that found in natural ecosystems (forests).
4. Microbiota from forests established after the abandonment of dehesas (open woodlands) was dominated by copiotrophic bacteria (e.g. Actinobacterias y Proteobacterias) and saprotroph fungi (ej. Ascomycota). These changes suggest an increase in soil carbon availability resulting from the spontaneous establishment of woody vegetation and the parallel increase in labile carbon from rhizodeposition and in litter deposition.
5. Holm oak land-use modulates the diversity, structure and sensitivity of soil core microbial communities. Therefore, more open and intensively managed ecosystems (dehesas) showed a highly sensitive microbiota to climate, whilst in more dense ecosystems (forests), they showed a higher sensitivity to availability of essential nutrients (e.g. ammonium and available phosphorus), suggesting a high impact of tree distribution over the soil microbial core community.
6. The modulating effect of Holm oak historical land-use on tree decline shows the high resilience of soil microbiota (bacteria and fungi) to tolerate perturbances caused by climate change.
7. Land-use modulates the effect of drought-induced defoliation in soil bacterial and fungal communities, i.e. in the most managed ecosystems the effect of tree

## GENERAL CONCLUSIONS

defoliation over soil fungal communities were more severe, while presenting a more resilient bacterial community, since the bacterial community is predominantly associated of the herbaceous layer.

8. The high resilience shown by fungal communities in forest ecosystems suggests a rapid regeneration of the systems after the perturbation, while, under more intensive management, like dehesas, fungal community were less resilient and dominated by saprotrophs specialized in the decomposition of recalcitrant forms of carbon (e.g. Ascomycota).
9. In more open and intensively managed ecosystems, the parallelism found between the structure and abundance of soil microbial communities under no influence of the tree with the trends followed when tree defoliated and died suggests that, as the aerial part of the system, soil microbial communities are moving towards new equilibriums. In these new stages, microbial communities appear, taxonomically and functionally, more associated with grassland-like ecosystems.

## **BIBLIOGRAFÍA**

Abdel-Hamid, A.M., Solbiati, J.O., Cann, I.K.O., 2013. Chapter One - Insights into Lignin Degradation and its Potential Industrial Applications, In: Sariaslani, S., Gadd, G.M. (Eds.), *Advances in Applied Microbiology*. Academic Press, pp. 1-28.

Adams, H.D., Macalady, A.K., Breshears, D.D., Allen, C.D., Stephenson, N.L., Saleska, S.R., Huxman, T.E., McDowell, N.G., 2010. Climate-Induced Tree Mortality: Earth System Consequences. *Eos, Transactions American Geophysical Union* 91, 153-154.

Ales, R.F., Martin, A., Ortega, F., Ales, E.E., 1992. Recent changes in landscape structure and function in a mediterranean region of SW Spain (1950–1984). *Landscape Ecology* 7, 3-18.

Alía, R., García del Barrio, J.M., Iglesias, S., Mancha, J.A., De Miguel, J., Nicolás, J.L., Pérez Martín, F., Sánchez Ron, D., 2009. Regiones de procedencia de especies forestales en España. *Organismo Autónomo Parques Nacionales*, pp. 251-259.

Allen, C.D., Breshears, D.D., 1998. Drought-induced shift of a forest–woodland ecotone: Rapid landscape response to climate variation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 14839.

Allen, C.D., Macalady, A.K., Chenchouni, H., Bachelet, D., McDowell, N., Vennetier, M., Kitzberger, T., Rigling, A., Breshears, D.D., Hogg, E.H., Gonzalez, P., Fensham, R., Zhang, Z., Castro, J., Demidova, N., Lim, J.-H., Allard, G., Running, S.W., Semerci, A., Cobb, N., 2010. A global overview of drought and heat-induced tree mortality reveals emerging climate change risks for forests. *Forest Ecology and Management* 259, 660-684.

Allison, L.E., Moodie, C.D., 1965. Carbonate, Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties. *American Society of Agronomy*, pp. 1379-1396.

American Meteorological Society, 2012. Aridity. Glossary of Meteorology. [Available online at <http://glossary.ametsoc.org/wiki/Aridity>].

Anderegg, W.R.L., Kane, J.M., Anderegg, L.D.L., 2012. Consequences of widespread tree mortality triggered by drought and temperature stress. *Nature Climate Change* 3, 30.

Anderson, C., Beare, M., Buckley, H.L., Lear, G., 2017. Bacterial and fungal communities respond differently to varying tillage depth in agricultural soils. *PeerJ* 5, e3930.

Anderson, J.P.E., Domsch, K.H., 1978. A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. *Soil Biology and Biochemistry* 10, 215-221.

Andrews, S., 2010. FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.

Avila, J.M., Gallardo, A., Gómez-Aparicio, L., 2019. Pathogen-induced tree mortality interacts with predicted climate change to alter soil respiration and nutrient availability in Mediterranean systems. *Biogeochemistry* 142, 53–71.

Avila, J.M., Gallardo, A., Ibáñez, B., Gómez-Aparicio, L., Turnbull, M., 2016. *Quercus suber* dieback alters soil respiration and nutrient availability in Mediterranean forests. *Journal of Ecology* 104, 1441-1452.

Ayanz, A.S.M., 1994. La dehesa española: origen, tipología, características y gestión. Fundación Conde del Valle de Salazar.

Azcón-Aguilar, C., Barea, J.M., 2015. Nutrient cycling in the mycorrhizosphere. *Journal of soil science and plant nutrition* 15, 372-396.

## BIBLIOGRAFÍA

Bandera-Fernández, E., Pérez-Pelea, L., 2018. Los modelos lineales generalizados mixtos. Su aplicación en el mejoramiento de plantas. *Cultivos Tropicales* 39, 127-133.

Bandounas, L., Wierckx, N.J.P., de Winde, J.H., Ruijsenaars, H.J., 2011. Isolation and characterization of novel bacterial strains exhibiting ligninolytic potential. *BMC Biotechnology* 11, 94.

Banerjee, S., Baah-Acheamfour, M., Carlyle, C.N., Bissett, A., Richardson, A.E., Siddique, T., Bork, E.W., Chang, S.X., 2016a. Determinants of bacterial communities in Canadian agroforestry systems. *Environmental Microbiology* 18, 1805-1816.

Banerjee, S., Kirkby, C.A., Schmutter, D., Bissett, A., Kirkegaard, J.A., Richardson, A.E., 2016b. Network analysis reveals functional redundancy and keystone taxa amongst bacterial and fungal communities during organic matter decomposition in an arable soil. *Soil Biology and Biochemistry* 97, 188-198.

Barakat, M., Cheviron, B., Angulo-Jaramillo, R., 2016. Influence of the irrigation technique and strategies on the nitrogen cycle and budget: A review. *Agricultural Water Management* 178, 225-238.

Barba, J., Curiel Yuste, J., Martínez-Vilalta, J., Lloret, F., 2013. Drought-induced tree species replacement is reflected in the spatial variability of soil respiration in a mixed Mediterranean forest. *Forest Ecology and Management* 306, 79-87.

Barba, J., Curiel Yuste, J., Poyatos, R., Janssens, I., Lloret, F., 2016a. Strong resilience of soil respiration components to drought-induced die-off resulting in forest secondary succession. *Oecologia*, 1-15.

Barba, J., Lloret, F., Curiel Yuste, J., 2016b. Effects of drought-induced forest die-off on litter decomposition. *Plant and Soil* 402, 91-101.

Barbeta, A., Mejía-Chang, M., Ogaya, R., Voltas, J., Dawson, T.E., Peñuelas, J., 2015. The combined effects of a long-term experimental drought and an extreme drought on the use of plant-water sources in a Mediterranean forest. *Global Change Biology* 21, 1213-1225.

Barbeta, A., Peñuelas, J., 2016. Sequence of plant responses to droughts of different timescales: lessons from holm oak (*Quercus ilex*) forests. *Plant Ecology & Diversity* 9, 321-338.

Barea, J.M., Pozo, M.J., Azcón, R., Azcón-Aguilar, C., 2013. Microbial Interactions in the Rhizosphere, In: Bruijn, F.J.d. (Ed.), *Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere*, pp. 29-44.

Barnard, R.L., Osborne, C.A., Firestone, M.K., 2013. Responses of soil bacterial and fungal communities to extreme desiccation and rewetting. *The Isme Journal* 7, 2229-2241.

Barto, E.K., Weidenhamer, J.D., Cipollini, D., Rillig, M.C., 2012. Fungal superhighways: do common mycorrhizal networks enhance below ground communication? *Trends in Plant Science* 17, 633-637.

Bartram, A.K., Lynch, M.D.J., Stearns, J.C., Moreno-Hagelsieb, G., Neufeld, J.D., 2011. Generation of Multimillion-Sequence 16S rRNA Gene Libraries from Complex Microbial Communities by Assembling Paired-End Illumina Reads. *Appl Environ Microbiol* 77, 3846-3852.

Bastida, F., López-Mondéjar, R., Baldrian, P., Andrés-Abellán, M., Jehmlich, N., Torres, I.F., García, C., López-Serrano, F.R., 2019. When drought meets forest management: Effects on the soil microbial community of a Holm oak forest ecosystem. *Science of The Total Environment* 662, 276-286.

Bengtsson, G., Bengtson, P., Månsson, K.F., 2003. Gross nitrogen mineralization-, immobilization-, and nitrification rates as a function of soil C/N ratio and microbial activity. *Soil Biology and Biochemistry* 35, 143-154.

Binkley, D., Stape, J.L., Takahashi, E.N., Ryan, M.G., 2006. Tree-girdling to separate root and heterotrophic respiration in two Eucalyptus stands in Brazil. *Oecologia* 148, 447-454.

Birch, H.F., 1958. The effect of soil drying on humus decomposition and nitrogen availability. *Plant and Soil* 10, 9-31.

Blagodatskaya, E., Kuzyakov, Y., 2008. Mechanisms of real and apparent priming effects and their dependence on soil microbial biomass and community structure: critical review. *Biology and Fertility of Soils* 45, 115-131.

Blume, H.-P., Brümmer, G.W., Fleige, H., Horn, R., Kandeler, E., Kögel-Knabner, I., Kretzschmar, R., Stahr, K., Wilke, B.-M., 2016. Soil-Plant Relations, In: Blume, H.-P., Brümmer, G.W., Fleige, H., Horn, R., Kandeler, E., Kögel-Knabner, I., Kretzschmar, R., Stahr, K., Wilke, B.-M. (Eds.), *Scheffer/Schachtschabel Soil Science*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 409-484.

Bokulich, N.A., Subramanian, S., Faith, J.J., Gevers, D., Gordon, J.I., Knight, R., Mills, D.A., Caporaso, J.G., 2013. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nature Methods* 10, 57-59.

Bolan, N.S., 1991. A critical review on the role of mycorrhizal fungi in the uptake of phosphorus by plants. *Plant and Soil* 134, 189-207.

Brundrett, M.C., 2009. Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. *Plant and Soil* 320, 37-77.

Burriel, F., Hernando, V., 1950. El fósforo en los suelos españoles. V. Nuevo método para la determinar el fósforo asimilable en los suelos. *Anales de Edafología y Agrobiología* 9, 611-622.

Caetano, P., Sánchez, J.E., Sánchez, M.E., Trapero, A., 2010. Podredumbre radical de la encina y el alcornoque. *Consejería de medio Ambiente*.

Camarero, J.J., Franquesa, M., Sangüesa-Barreda, G., 2015. Timing of Drought Triggers Distinct Growth Responses in Holm Oak: Implications to Predict Warming-Induced Forest Defoliation and Growth Decline. *Forests* 6, 1576.

Camarero, J.J., Vergarechea, M., Sangüesa-Barreda, G., Corrià Ainslie, R., 2014. ¿Condiciona la estructura del monte y el crecimiento previo el decaimiento inducido por la sequía en dos especies de Quercus? *Ecosistemas: Revista científica y técnica de ecología y medio ambiente* 23, 73-81.

Campos Palacín, P., Naredo Pérez, J.M., 1980. Los balances energéticos de la agricultura española.

Campos-Palacín, P., 1986. *Economía y energía en la dehesa extremeña*, Madrid: Instituto de Estudios Agrarios, Pesqueros y Alimentarios.

Canadell, J.G., Raupach, M.R., 2008. Managing Forests for Climate Change Mitigation. *Science* 320, 1456.

Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., Fierer, N., Peña, A.G., Goodrich, J.K., Gordon, J.I., Huttley, G.A., Kelley, S.T., Knights, D., Koenig, J.E., Ley, R.E., Lozupone, C.A., McDonald, D., Muegge, B.D., Pirrung, M., Reeder, J., Sevinsky, J.R., Turnbaugh, P.J., Walters, W.A., Widmann, J., Yatsunenko, T., Zaneveld, J., Knight, R., 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods* 7, 335.

## BIBLIOGRAFÍA

Carnicer, J., Coll, M., Ninyerola, M., Pons, X., Sánchez, G., Peñuelas, J., 2011. Widespread crown condition decline, food web disruption, and amplified tree mortality with increased climate change-type drought. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 1474-1478.

Carnicer, J., Coll, M., Pons, X., Ninyerola, M., Vayreda, J., Peñuelas, J., 2014. Large-scale recruitment limitation in Mediterranean pines: the role of *Quercus ilex* and forest successional advance as key regional drivers. *Global Ecology and Biogeography* 23, 371-384.

Casals, P., Gimeno, C., Carrara, A., Lopez-Sangil, L., Sanz, M., 2009. Soil CO<sub>2</sub> efflux and extractable organic carbon fractions under simulated precipitation events in a Mediterranean Dehesa. *Soil Biology and Biochemistry* 41, 1915-1922.

Castro, J., Zamora, R., Hódar, J.A., Gómez, J.M., 2004. Seedling establishment of a boreal tree species (*Pinus sylvestris*) at its southernmost distribution limit: consequences of being in a marginal Mediterranean habitat. *Journal of Ecology* 92, 266-277.

Chen, X., Tung, K.-K., 2018. Global surface warming enhanced by weak Atlantic overturning circulation. *Nature* 559, 387-391.

Chen, Y.-T., Borken, W., Stange, C.F., Matzner, E., 2011. Effects of decreasing water potential on gross ammonification and nitrification in an acid coniferous forest soil. *Soil Biology and Biochemistry* 43, 333-338.

Christensen, J., Kanikicharla, K., Aldrian, E., An, S.-I., Fonseca, I., Castro, M., Dong, W., Goswami, P., Hall, A., Kanyanga, J.K., Kitoh, A., Kossin, J., Lau, N.-C., Renwick, J., Stephenson, D., Xie, S.-P., Zhou, T., 2013. Climate Phenomena and their Relevance for Future Regional Climate Change, pp. 1-92.

Chui, T.F.M., Terry, J.P., 2013. Influence of sea-level rise on freshwater lenses of different atoll island sizes and lens resilience to storm-induced salinization. *Journal of Hydrology* 502, 18-26.

Clemmensen, K.E., Bahr, A., Ovaskainen, O., Dahlberg, A., Ekblad, A., Wallander, H., Stenlid, J., Finlay, R.D., Wardle, D.A., Lindahl, B.D., 2013. Roots and Associated Fungi Drive Long-Term Carbon Sequestration in Boreal Forest. *Science* 339, 1615.

Cole, J.R., Wang, Q., Fish, J.A., Chai, B., McGarrell, D.M., Sun, Y., Brown, C.T., Porras-Alfaro, A., Kuske, C.R., Tiedje, J.M., 2014. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Research* 42, D633-D642.

Comte, J., Lovejoy, C., Crevecoeur, S., Vincent, W.F., 2016. Co-occurrence patterns in aquatic bacterial communities across changing permafrost landscapes. *Biogeosciences* 13, 175-190.

Corcobado, T., Cubera, E., Juárez, E., Moreno, G., Solla, A., 2014. Drought events determine performance of *Quercus ilex* seedlings and increase their susceptibility to *Phytophthora cinnamomi*. *Agricultural and Forest Meteorology* 192-193, 1-8.

Corcobado, T., Cubera, E., Moreno, G., Solla, A., 2013a. *Quercus ilex* forests are influenced by annual variations in water table, soil water deficit and fine root loss caused by *Phytophthora cinnamomi*. *Agricultural and Forest Meteorology* 169, 92-99.

Corcobado, T., Solla, A., Madeira, M.A., Moreno, G., 2013b. Combined effects of soil properties and *Phytophthora cinnamomi* infections on *Quercus ilex* decline. *Plant and Soil* 373, 403-413.

Crowley, T.J., 2000. Causes of Climate Change Over the Past 1000 Years. *Science* 289, 270.

Cuesta, B., Rey Benayas, J.M., Gallardo, A., Villar-Salvador, P., González-Espinosa, M., 2012. Soil chemical properties in abandoned Mediterranean cropland after succession and oak reforestation. *Acta Oecologica* 38, 58-65.

Curiel Yuste, J., Baldocchi, D.D., Gershenson, A., Goldstein, A., Misson, L., Wong, S., 2007. Microbial soil respiration and its dependency on carbon inputs, soil temperature and moisture. *Global Change Biology* 13, 2018-2035.

Curiel Yuste, J., Barba, J., Fernandez-Gonzalez, A.J., Fernandez-Lopez, M., Mattana, S., Martinez-Vilalta, J., Nolis, P., Lloret, F., 2012. Changes in soil bacterial community triggered by drought-induced gap succession preceded changes in soil C stocks and quality. *Ecology and Evolution* 2, 3016-3031.

Curiel Yuste, J., Fernandez-Gonzalez, A.J., Fernandez-Lopez, M., Ogaya, R., Penuelas, J., Sardans, J., Lloret, F., 2014. Strong functional stability of soil microbial communities under semiarid Mediterranean conditions and subjected to long-term shifts in baseline precipitation. *Soil Biology and Biochemistry* 69, 223-233.

Curiel Yuste, J., Flores-Rentería, D., García-Angulo, D., Hereş, A.M., Bragă, C., Petritan, A.M., Petritan, I.C., 2019. Cascading effects associated with climate-change-induced conifer mortality in mountain temperate forests result in hot-spots of soil CO<sub>2</sub> emissions. *Soil Biology and Biochemistry* 133, 50-59.

Curiel Yuste, J., Heres, A.-M., Ojeda, G., Paz, A., Pizano, C., Garcia-Angulo, D., Lasso, E., 2017. Soil heterotrophic CO<sub>2</sub> emissions from tropical high-elevation ecosystems (Paramos) and their sensitivity to temperature and moisture fluctuations. *Soil Biology & Biochemistry* 110, 8-11.

Curiel Yuste, J., Janssens, I.A., Carrara, A., Meiresonne, L., Ceulemans, R., 2003. Interactive effects of temperature and precipitation on soil respiration in a temperate maritime pine forest. *Tree Physiol* 23, 1263-1270.

Curiel Yuste, J., Peñuelas, J., Estiarte, M., Garcia-Mas, J., Mattana, S., Ogaya, R., Pujol, M., Sardans, J., 2011. Drought-resistant fungi control soil organic matter decomposition and its response to temperature. *Global Change Biology* 17, 1475-1486.

Daims, H., Lückner, S., Wagner, M., 2016. A New Perspective on Microbes Formerly Known as Nitrite-Oxidizing Bacteria. *Trends in Microbiology* 24, 699-712.

de Bastos, D.F., Magiero, E.C., Tomazi, M., Schirmann, J., Veloso, M.G., de Faccio Carvalho, P.C., Bayer, C., 2019. A 3-year assessment of nitrous oxide emission factors for urine and dung of grazing sheep in a subtropical ecosystem. *Journal of Soils and Sediments*.

de Carvalho, T.S., Jesus, E.d.C., Barlow, J., Gardner, T.A., Soares, I.C., Tiedje, J.M., Moreira, F.M.d.S., 2016. Land use intensification in the humid tropics increased both alpha and beta diversity of soil bacteria. *Ecology* 97, 2760-2771.

de Graaff, M.-A., Classen, A.T., Castro, H.F., Schadt, C.W., 2010. Labile soil carbon inputs mediate the soil microbial community composition and plant residue decomposition rates. *New Phytologist* 188, 1055-1064.

de Sampaio e Paiva Camilo-Alves, C., 2013. Decline of Mediterranean oak trees and its association with *Phytophthora cinnamomi*: a review. *European journal of forest research* v. 132, pp. 411-432-2013 v.2132 no.2013.

de Sampaio e Paiva Camilo-Alves, C., da Clara, M.I.E., de Almeida Ribeiro, N.M.C., 2013. Decline of Mediterranean oak trees and its association with *Phytophthora cinnamomi*: a review. *European Journal of Forest Research* 132, 411-432.



## BIBLIOGRAFÍA

del Río, M., Bravo-Oviedo, A., Pretzsch, H., Löf, M., Ruiz-Peinado, R., 2017. A review of thinning effects on Scots pine stands: From growth and yield to new challenges under global change. *Forest Systems*; Vol 26, No 2 (2017) DO - 10.5424/fs/2017262-11325.

Delgado-Baquerizo, M., Oliverio, A.M., Brewer, T.E., Benavent-González, A., Eldridge, D.J., Bardgett, R.D., Maestre, F.T., Singh, B.K., Fierer, N., 2018. A global atlas of the dominant bacteria found in soil. *Science* 359, 320.

Demolon, A., Leroux, D., 1952. *Guide Pour l'Etude Experimentale du Sol*. Second Edition. *Soil Science* 74, 405.

Deng, Q., Hui, D., Dennis, S., Reddy, K.C., 2017. Responses of terrestrial ecosystem phosphorus cycling to nitrogen addition: A meta-analysis. *Global Ecology and Biogeography* 26, 713-728.

Di, H.J., Cameron, K.C., 2002. Nitrate leaching in temperate agroecosystems: sources, factors and mitigating strategies. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 64, 237-256.

Diagne, N., Thioulouse, J., Sanguin, H., Prin, Y., Krasova-Wade, T., Sylla, S., Galiana, A., Baudoin, E., Neyra, M., Svistoonoff, S., Lebrun, M., Duponnois, R., 2013. Ectomycorrhizal diversity enhances growth and nitrogen fixation of *Acacia mangium* seedlings. *Soil Biology and Biochemistry* 57, 468-476.

Diaz, M., Campos, P., Pulido, F.J., 1997. The Spanish dehesas: a diversity in land-use and wildlife. *Farming and birds in Europe* 178, 178-209.

Dobbelaere, S., Vanderleyden, J., Okon, Y., 2003. Plant Growth-Promoting Effects of Diazotrophs in the Rhizosphere. *Critical Reviews in Plant Sciences* 22, 107-149.

Dufrêne, M., Legendre, P., 1997. SPECIES ASSEMBLAGES AND INDICATOR SPECIES: THE NEED FOR A FLEXIBLE ASYMMETRICAL APPROACH. *Ecological Monographs* 67, 345-366.

Edburg, S.L., Hicke, J.A., Brooks, P.D., Pendall, E.G., Ewers, B.E., Norton, U., Gochis, D., Gutmann, E.D., Meddens, A.J., 2012. Cascading impacts of bark beetle-caused tree mortality on coupled biogeophysical and biogeochemical processes. *Frontiers in Ecology and the Environment* 10, 416-424.

Edgar, R.C., 2014. *Taxonomy benchmark tests, USEARCH manual v5.2*.

Elliott, K.J., Vose, J.M., Knoepp, J.D., Clinton, B.D., Kloeppel, B.D., 2015. Functional Role of the Herbaceous Layer in Eastern Deciduous Forest Ecosystems. *Ecosystems* 18, 221-236.

Evans, P.M., Newton, A.C., Cantarello, E., Martin, P., Sanderson, N., Jones, D.L., Barsoum, N., Cottrell, J.E., A'Hara, S.W., Fuller, L., 2017. Thresholds of biodiversity and ecosystem function in a forest ecosystem undergoing dieback. *Scientific Reports* 7, 6775.

FAO, 2017. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. Rome, Italy.

Faust, K., Raes, J., 2012. Microbial interactions: from networks to models. *Nature Reviews Microbiology* 10, 538.

Felcísimo, Á.M., Muñoz, J., Villalba, C.J., Mateo, R.G., 2011. Impactos, vulnerabilidad y adaptación al cambio climático de la biodiversidad española. 1. Flora y vegetación. Oficina Española de Cambio Climático, Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, Madrid.

Fensham, R.J., Fairfax, R.J., Ward, D.P., 2009. Drought-induced tree death in savanna. *Global Change Biology* 15, 380-387.

Fernandez Ales, R., Martin, A., Ortega, F., Ales, E.E., 1992. Recent changes in landscape structure and function in a mediterranean region of SW Spain (1950–1984). *Landscape Ecology* 7, 3-18.

Fernandez, H., Romero, F., Peralta, M., Grosso, L., 2001. La diversidad del zoobentos en ríos de montaña del noroeste de Argentina: comparación entre seis ríos.

Fernández-Calviño, D., Bååth, E., 2010. Growth response of the bacterial community to pH in soils differing in pH. *FEMS Microbiol Ecol* 73, 149-156.

Fernández-González, A.J., Martínez-Hidalgo, P., Cobo-Díaz, J.F., Villadas, P.J., Martínez-Molina, E., Toro, N., Tringe, S.G., Fernández-López, M., 2017. The rhizosphere microbiome of burned holm-oak: potential role of the genus *Arthrobacter* in the recovery of burned soils. *Scientific Reports* 7, 6008.

Ferrio, J.P., Florit, A., Vega, A., Serrano, L., Voltas, J., 2003.  $\delta^{13}\text{C}$  and tree-ring width reflect different drought responses in *Quercus ilex* and *Pinus halepensis*. *Oecologia* 137, 512-518.

Fichtner, A., Sturm, K., Rickert, C., Härdtle, W., Schrautzer, J., 2012. Competition response of European beech *Fagus sylvatica* L. varies with tree size and abiotic stress: minimizing anthropogenic disturbances in forests. *Journal of Applied Ecology* 49, 1306-1315.

Fierer, N., 2017. Embracing the unknown: disentangling the complexities of the soil microbiome. *Nature Reviews Microbiology* 15, 579.

Fierer, N., Jackson, R.B., 2006. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 626.

Fierer, N., Ladau, J., Clemente, J.C., Leff, J.W., Owens, S.M., Pollard, K.S., Knight, R., Gilbert, J.A., McCulley, R.L., 2013. Reconstructing the Microbial Diversity and Function of Pre-Agricultural Tallgrass Prairie Soils in the United States. *Science* 342, 621.

Fischer, G., Nachtergaele, F., Prieler, S., van Velthuizen, H.T., Verelst, L., Wiberg, D., 2008. Global Agro-ecological Zones Assessment for Agriculture (GAEZ 2008). IIASA, Laxenburg, Austria and FAO, Rome, Italy.

Fisher, C.K., Mehta, P., 2014. Identifying Keystone Species in the Human Gut Microbiome from Metagenomic Timeseries Using Sparse Linear Regression. *PLoS ONE* 9, e102451.

Flores-Rentería, D., Rincón, A., Morán-López, T., Hereş, A.-M., Pérez-Izquierdo, L., Valladares, F., Curiel Yuste, J., 2018. Habitat fragmentation is linked to cascading effects on soil functioning and CO<sub>2</sub> emissions in Mediterranean holm-oak-forests. *PeerJ* 6, e5857.

Flores-Rentería, D., Rincón, A., Valladares, F., Curiel Yuste, J., 2016. Agricultural matrix affects differently the alpha and beta structural and functional diversity of soil microbial communities in a fragmented Mediterranean holm oak forest. *Soil Biology and Biochemistry* 92, 79-90.

Franche, C., Lindström, K., Elmerich, C., 2009. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant and Soil* 321, 35-59.

Friedman, J., Hastie, T., Tibshirani, R., 2007. Sparse inverse covariance estimation with the graphical lasso. *Biostatistics* 9, 432-441.

Fuhrman, J.A., 2009. Microbial community structure and its functional implications. *Nature* 459, 193.

## BIBLIOGRAFÍA

Furze, J.R., Martin, A.R., Nasielski, J., Thevathasan, N.V., Gordon, A.M., Isaac, M.E., 2017. Resistance and resilience of root fungal communities to water limitation in a temperate agroecosystem. *Ecology and Evolution* 7, 3443-3454.

Gallardo, A., Morcuende, D., Solla, A., Moreno, G., Pulido, F., Quesada, A., 2019. Regulation by biotic stress of tannins biosynthesis in *Quercus ilex*: Crosstalk between defoliation and *Phytophthora cinnamomi* infection. *Physiologia Plantarum* 165, 319-329.

García-Angulo, D., Fernández-López, M., Flores, O., Hereş, A.M., Sanz, M.J., Rey, A., Valladares, F., Curiel Yuste, J., submitted. Tree mortality exacerbated climate-induced changes in soil stoichiometry and soil nutrient cycling. *Soil Biology and Biochemistry*.

Gazol, A., Camarero, J.J., Jiménez, J.J., Moret-Fernández, D., López, M.V., Sangüesa-Barreda, G., Igual, J.M., 2018a. Beneath the canopy: Linking drought-induced forest die off and changes in soil properties. *Forest Ecology and Management* 422, 294-302.

Gazol, A., Camarero, J.J., Sangüesa-Barreda, G., Vicente-Serrano, S.M., 2018b. Post-drought Resilience After Forest Die-Off: Shifts in Regeneration, Composition, Growth and Productivity. *Frontiers in Plant Science* 9.

Goberna, M., Navarro-Cano Jose, A., Verdú, M., 2016. Opposing phylogenetic diversity gradients of plant and soil bacterial communities. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 283, 20153003.

Gómez-Aparicio, L., Domínguez-Begines, J., Kardol, P., Ávila, J.M., Ibáñez, B., García, L.V., 2017. Plant-soil feedbacks in declining forests: implications for species coexistence. *Ecology* 98, 1908-1921.

Gómez-Aparicio, L., Ibáñez, B., Serrano, M.S., De Vita, P., Ávila, J.M., Pérez-Ramos, I.M., García, L.V., Esperanza Sánchez, M., Marañón, T., 2012. Spatial patterns of soil pathogens in declining Mediterranean forests: implications for tree species regeneration. *New Phytologist* 194, 1014-1024.

Gómez-Aparicio, L., Pérez-Ramos, I.M., Mendoza, I., Matías, L., Quero, J.L., Castro, J., Zamora, R., Marañón, T., 2008. Oak seedling survival and growth along resource gradients in Mediterranean forests: implications for regeneration in current and future environmental scenarios. *Oikos* 117, 1683-1699.

Gómez-Rey, M.X., Garcês, A., Madeira, M., 2012. Soil organic-C accumulation and N availability under improved pastures established in Mediterranean oak woodlands. *Soil Use and Management* 28, 497-507.

Gougoulias, C., Clark, J.M., Shaw, L.J., 2014. The role of soil microbes in the global carbon cycle: tracking the below-ground microbial processing of plant-derived carbon for manipulating carbon dynamics in agricultural systems. *Journal of the science of food and agriculture* 94, 2362-2371.

Gregory, J.M., Oerlemans, J., 1998. Simulated future sea-level rise due to glacier melt based on regionally and seasonally resolved temperature changes. *Nature* 391, 474-476.

Griffin, J.M., Turner, M.G., Simard, M., 2011. Nitrogen cycling following mountain pine beetle disturbance in lodgepole pine forests of Greater Yellowstone. *Forest Ecology and Management* 261, 1077-1089.

Griffiths, B.S., Philippot, L., 2013. Insights into the resistance and resilience of the soil microbial community. *FEMS Microbiology Reviews* 37, 112-129.

Grossiord, C., Gessler, A., Granier, A., Pollastrini, M., Bussotti, F., Bonal, D., 2014. Interspecific competition influences the response of oak transpiration to increasing drought stress in a mixed Mediterranean forest. *Forest Ecology and Management* 318, 54-61.

Grosso, F., Bååth, E., De Nicola, F., 2016. Bacterial and fungal growth on different plant litter in Mediterranean soils: Effects of C/N ratio and soil pH. *Applied Soil Ecology* 108, 1-7.

Grüning, M.M., Simon, J., Rennenberg, H., I-M-Arnold, A., 2017. Defoliating Insect Mass Outbreak Affects Soil N Fluxes and Tree N Nutrition in Scots Pine Forests. *Frontiers in Plant Science* 8.

Guo, X., Xia, X., Tang, R., Zhou, J., Zhao, H., Wang, K., 2008. Development of a real-time PCR method for Firmicutes and Bacteroidetes in faeces and its application to quantify intestinal population of obese and lean pigs. *Letters in Applied Microbiology* 47, 367-373.

Guzmán Álvarez, J.R., 2016. The image of a tamed landscape: dehesa through History in Spain. *Culture & History Digital Journal*; Vol 5, No 1 (2016) DO - 10.3989/chdj.2016.003.

Hartmann, A., Rothballer, M., Schmid, M., 2008. Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. *Plant and Soil* 312, 7-14.

He, M., Dijkstra, F.A., 2015. Phosphorus addition enhances loss of nitrogen in a phosphorus-poor soil. *Soil Biology and Biochemistry* 82, 99-106.

Hereş, A.-M., Kaye, M.W., Granda, E., Benavides, R., Lázaro-Nogal, A., Rubio-Casal, A.E., Valladares, F., Curiel Yuste, J., 2018. Tree vigour influences secondary growth but not responsiveness to climatic variability in Holm oak. *Dendrochronologia* 49, 68-76.

Hereş, A.-M., Martínez-Vilalta, J., Claramunt López, B., 2012. Growth patterns in relation to drought-induced mortality at two Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) sites in NE Iberian Peninsula. *Trees* 26, 621-630.

Herren, C.M., McMahon, K.D., 2018. Keystone taxa predict compositional change in microbial communities. *Environmental Microbiology* 20, 2207-2217.

Herridge, D.F., Peoples, M.B., Boddey, R.M., 2008. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. *Plant and Soil* 311, 1-18.

Hicke, J.A., Allen, C.D., Desai, A.R., Dietze, M.C., Hall, R.J., Hogg, E.H., Kashian, D.M., Moore, D., Raffa, K.F., Sturrock, R.N., Vogelmann, J., 2012. Effects of biotic disturbances on forest carbon cycling in the United States and Canada. *Global Change Biology* 18, 7-34.

Hiiesalu, I., Pärtel, M., Davison, J., Gerhold, P., Metsis, M., Moora, M., Öpik, M., Vasar, M., Zobel, M., Wilson, S.D., 2014. Species richness of arbuscular mycorrhizal fungi: associations with grassland plant richness and biomass. *New Phytologist* 203, 233-244.

Hirabayashi, Y., Mahendran, R., Koirala, S., Konoshima, L., Yamazaki, D., Watanabe, S., Kim, H., Kanae, S., 2013. Global flood risk under climate change. *Nature Climate Change* 3, 816-821.

Hobbie, S.E., Eddy, W.C., Buyarski, C.R., Adair, E.C., Ogdahl, M.L., Weisenhorn, P., 2012. Response of decomposing litter and its microbial community to multiple forms of nitrogen enrichment. *Ecological Monographs* 82, 389-405.

Högberg, P., Nordgren, A., Buchmann, N., Taylor, A.F.S., Ekblad, A., Högberg, M.N., Nyberg, G., Ottosson-Löfvenius, M., Read, D.J., 2001. Large-scale forest girdling shows that current photosynthesis drives soil respiration. *Nature* 411, 789-792.

## BIBLIOGRAFÍA

Holtkamp, R., Kardol, P., van der Wal, A., Dekker, S.C., van der Putten, W.H., de Ruiter, P.C., 2008. Soil food web structure during ecosystem development after land abandonment. *Applied Soil Ecology* 39, 23-34.

Horwath, W., 2015. Chapter 12 - Carbon Cycling: The Dynamics and Formation of Organic Matter, In: Paul, E.A. (Ed.), *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry* (Fourth Edition). Academic Press, Boston, pp. 339-382.

Huang, J., Yu, H., Guan, X., Wang, G., Guo, R., 2016. Accelerated dryland expansion under climate change. *Nature Climate Change* 6, 166-171.

Hudson, C.M., Kirton, E., Hutchinson, M.I., Redfern, J.L., Simmons, B., Ackerman, E., Singh, S., Williams, K.P., Natvig, D.O., Powell, A.J., 2015. Lignin-modifying processes in the rhizosphere of arid land grasses. *Environmental Microbiology* 17, 4965-4978.

Huxman, T.E., Snyder, K.A., Tissue, D., Leffler, A.J., Ogle, K., Pockman, W.T., Sandquist, D.R., Potts, D.L., Schwinning, S., 2004. Precipitation pulses and carbon fluxes in semiarid and arid ecosystems. *Oecologia* 141, 254-268.

IPBES, 2019. Global assessment report on biodiversity and ecosystem services of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services. IPBES secretariat, Bonn, Germany.

IPCC, 2014. Impacts, Adaptation, and Vulnerability. Part a: Global and Sectoral Aspects. Contribution of Working Group II to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Field, C.B., V.R. Barros, D.J. Dokken, K.J.]. Cambridge University Press, United Kingdom and New York.

Jangid, K., Williams, M.A., Franzluebbers, A.J., Sanderlin, J.S., Reeves, J.H., Jenkins, M.B., Endale, D.M., Coleman, D.C., Whitman, W.B., 2008. Relative impacts of land-use, management intensity and fertilization upon soil microbial community structure in agricultural systems. *Soil Biology and Biochemistry* 40, 2843-2853.

Jangid, K., Williams, M.A., Franzluebbers, A.J., Schmidt, T.M., Coleman, D.C., Whitman, W.B., 2011. Land-use history has a stronger impact on soil microbial community composition than aboveground vegetation and soil properties. *Soil Biology and Biochemistry* 43, 2184-2193.

Janusz, G., Pawlik, A., Sulej, J., Świdarska-Burek, U., Jarosz-Wilkolazka, A., Paszczyński, A., 2017. Lignin degradation: microorganisms, enzymes involved, genomes analysis and evolution. *FEMS Microbiology Reviews* 41, 941-962.

Jenkins, J.C., Aber, J.D., Canham, C.D., 1999. Hemlock woolly adelgid impacts on community structure and N cycling rates in eastern hemlock forests. *Canadian Journal of Forest Research* 29, 630-645.

Jeong, S.-H., Eom, J.-Y., Park, J.-Y., Chun, J.-H., Lee, J.-S., 2018. Effect of precipitation on soil respiration in a temperate broad-leaved forest. *Journal of Ecology and Environment* 42, 10.

Jiao, F., Shi, X.-R., Han, F.-P., Yuan, Z.-Y., 2016. Increasing aridity, temperature and soil pH induce soil C-N-P imbalance in grasslands. *Scientific Reports* 6, 19601.

Joffre, R., Rambal, S., Ratte, J.P., 1999. The dehesa system of southern Spain and Portugal as a natural ecosystem mimic. *Agroforestry Systems* 45, 57-79.

Joly, F.-X., Milcu, A., Scherer-Lorenzen, M., Jean, L.-K., Bussotti, F., Dawud, S.M., Müller, S., Pollastrini, M., Raulund-Rasmussen, K., Vesterdal, L., Hättenschwiler, S., 2017. Tree species diversity

affects decomposition through modified micro-environmental conditions across European forests. *New Phytologist* 214, 1281-1293.

Jones, R.T., 2015. A Comprehensive Survey of Soil Rhizobiales Diversity Using High-Throughput DNA Sequencing, *Biological Nitrogen Fixation*. F. J. de Bruijn (Ed.).

Juretschko, S., Timmermann, G., Schmid, M., Schleifer, K.-H., Pommerening-Röser, A., Koops, H.-P., Wagner, M., 1998. Combined Molecular and Conventional Analyses of Nitrifying Bacterium Diversity in Activated Sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira*-Like Bacteria as Dominant Populations. *Appl Environ Microbiol* 64, 3042.

Kalra, Y.P., 1995. Determination of pH of soils by different methods: collaborative study. *Journal of AOAC International* 78, 310 - 324.

Kaňa, J., Tahovska, K., Kopáček, J., 2013. Response of soil chemistry to forest dieback after bark beetle infestation. *Biogeochemistry* 113: 369-383. *Biogeochemistry* 113, 369-383.

Kandeler, E., Boeddinghaus, R.S., Marhan, S., Keil, D., Niklaus, P.A., von Riedmatten, L.R., Dormann, C.F., Scherer-Lorenzen, M., 2015. Effects of warming and drought on potential N<sub>2</sub>O emissions and denitrifying bacteria abundance in grasslands with different land-use. *FEMS Microbiol Ecol* 91.

Kellogg, W., Schware, R., 2019. Climate Change and Society: Consequences of Increasing Atmospheric Carbon Dioxide.

Kerley, S.J., Read, D.J., 1998. The biology of mycorrhiza in the Ericaceae. XX. Plant and mycorrhizal necromass as nitrogenous substrates for the ericoid mycorrhizal fungus *Hymenoscyphus ericae* and its host. *New Phytologist* 139, 353-360.

Kjeldahl, J., 1883. Neue Methode zur Bestimmung des Stickstoffs in organischen Körpern. *Zeitschrift für analytische Chemie* 22, 366-382.

Koch, H., Lückner, S., Albertsen, M., Kitzinger, K., Herbold, C., Spieck, E., Nielsen, P.H., Wagner, M., Daims, H., 2015. Expanded metabolic versatility of ubiquitous nitrite-oxidizing bacteria from the genus *Nitrospira*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112, 11371.

Koch, O., Tscherko, D., Kandeler, E., 2007. Temperature sensitivity of microbial respiration, nitrogen mineralization, and potential soil enzyme activities in organic alpine soils. *Global Biogeochemical Cycles* 21, n/a-n/a.

Koide, R.T., Fernandez, C., Malcolm, G., 2014. Determining place and process: functional traits of ectomycorrhizal fungi that affect both community structure and ecosystem function. *New Phytologist* 201, 433-439.

Kozich, J.J., Westcott, S.L., Baxter, N.T., Highlander, S.K., Schloss, P.D., 2013. Development of a Dual-Index Sequencing Strategy and Curation Pipeline for Analyzing Amplicon Sequence Data on the MiSeq Illumina Sequencing Platform. *Appl Environ Microbiol* 79, 5112-5120.

Kurtz, Z.D., Müller, C.L., Miraldi, E.R., Littman, D.R., Blaser, M.J., Bonneau, R.A., 2015. Sparse and Compositionally Robust Inference of Microbial Ecological Networks. *PLOS Computational Biology* 11, e1004226.

Kuzyakov, Y., 2002. Review: Factors affecting rhizosphere priming effects. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 165, 382-396.

## BIBLIOGRAFÍA

- Lahti, L., Shetty, S., 2017. Tools for microbiome analysis in R. Version 1.9.1.
- Lal, R., 2004. Soil Carbon Sequestration Impacts on Global Climate Change and Food Security. *Science* 304, 1623.
- Lambers, H., Mougél, C., Jaillard, B., Hinsinger, P., 2009. Plant-microbe-soil interactions in the rhizosphere: an evolutionary perspective. *Plant and Soil* 321, 83-115.
- Landeweert, R., Hoffland, E., Finlay, R.D., Kuyper, T.W., van Breemen, N., 2001. Linking plants to rocks: ectomycorrhizal fungi mobilize nutrients from minerals. *Trends in Ecology & Evolution* 16, 248-254.
- Lange, M., Eisenhauer, N., Sierra, C.A., Bessler, H., Engels, C., Griffiths, R.I., Mellado-Vázquez, P.G., Malik, A.A., Roy, J., Scheu, S., Steinbeiss, S., Thomson, B.C., Trumbore, S.E., Gleixner, G., 2015. Plant diversity increases soil microbial activity and soil carbon storage. *Nature Communications* 6, 6707.
- Larsen, K.S., Andresen, L.C., Beier, C., Jonasson, S., Albert, K.R., Ambus, P., Arndal, M.F., Carter, M.S., Christensen, S., Holmstrup, M., Ibrom, A., Kongstad, J., Van Der Linden, L., Maraldo, K., Michelsen, A., Mikkelsen, T.N., Pilegaard, K., Priemé, A., Ro-Poulsen, H., Schmidt, I.K., Selsted, M.B., Stevnbak, K., 2011. Reduced N cycling in response to elevated CO<sub>2</sub>, warming, and drought in a Danish heathland: Synthesizing results of the CLIMAITE project after two years of treatments. *Global Change Biology* 17, 1884-1899.
- Lauber, C.L., Hamady, M., Knight, R., Fierer, N., 2009. Pyrosequencing-Based Assessment of Soil pH as a Predictor of Soil Bacterial Community Structure at the Continental Scale. *Appl Environ Microbiol* 75, 5111.
- Lavee, H., Imeson, A.C., Sarah, P., 1998. The impact of climate change on geomorphology and desertification along a mediterranean-arid transect. *Land Degradation & Development* 9, 407-422.
- Le Mer, J., Roger, P., 2001. Production, oxidation, emission and consumption of methane by soils: A review. *European Journal of Soil Biology* 37, 25-50.
- Lefcheck, J.S., 2016. piecewiseSEM: Piecewise structural equation modelling in r for ecology, evolution, and systematics. *Methods in Ecology and Evolution* 7, 573-579.
- Lehmann, A., Zheng, W., Ryo, M., Soutschek, K., Roy, J., Rongstock, R., Maaß, S., Rillig, M.C., 2020. Fungal Traits Important for Soil Aggregation. *Frontiers in Microbiology* 10.
- Leonowicz, A., Matuszewska, A., Luterek, J., Ziegenhagen, D., Wojtaś-Wasilewska, M., Cho, N.-S., Hofrichter, M., Rogalski, J., 1999. Biodegradation of Lignin by White Rot Fungi. *Fungal Genetics and Biology* 27, 175-185.
- Li, X., Sørensen, P., Olesen, J.E., Petersen, S.O., 2016. Evidence for denitrification as main source of N<sub>2</sub>O emission from residue-amended soil. *Soil Biology and Biochemistry* 92, 153-160.
- Liang, C., Balser, T.C., 2010. Microbial production of recalcitrant organic matter in global soils: implications for productivity and climate policy. *Nature Reviews Microbiology* 9, 75.
- Linares, A.M., 2007. Forest planning and traditional knowledge in collective woodlands of Spain: The dehesa system. *Forest Ecology and Management* 249, 71-79.
- Lloret, F., Kitzberger, T., 2018. Historical and event-based bioclimatic suitability predicts regional forest vulnerability to compound effects of severe drought and bark beetle infestation. *Global Change Biology* 24, 1952-1964.

- Lloret, F., Mattana, S., Curiel Yuste, J., 2015. Climate-induced die-off affects plant-soil-microbe ecological relationship and functioning. *FEMS Microbiol Ecol* 91, 1-12.
- Lloret, F., Siscart, D., Dalmases, C., 2004. Canopy recovery after drought dieback in holm-oak Mediterranean forests of Catalonia (NE Spain). *Global Change Biology* 10, 2092-2099.
- López-Sánchez, A., Schroeder, J., Roig, S., Sobral, M., Dirzo, R., 2014. Effects of Cattle Management on Oak Regeneration in Northern Californian Mediterranean Oak Woodlands. *PLoS ONE* 9, e105472.
- Lopez-Sangil, L., Rousk, J., Wallander, H., Casals, P., 2011. Microbial growth rate measurements reveal that land-use abandonment promotes a fungal dominance of SOM decomposition in grazed Mediterranean ecosystems. *Biology and Fertility of Soils* 47, 129-138.
- Lucas-Borja, M.E., Hedro, J., Cerdá, A., Candel-Pérez, D., Viñegla, B., 2016. Unravelling the importance of forest age stand and forest structure driving microbiological soil properties, enzymatic activities and soil nutrients content in Mediterranean Spanish black pine (*Pinus nigra* Ar. ssp. *salzmannii*) Forest. *Science of The Total Environment* 562, 145-154.
- Lupon, A., Gerber, S., Sabater, F., Bernal, S., 2015. Climate response of the soil nitrogen cycle in three forest types of a headwater Mediterranean catchment. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences* 120, 859-875.
- M.A.P.A., 1986. *Metodos oficiales de analisis*. Tomo III. Mundi-Prensa, Madrid.
- Ma, A., Zhuang, X., Wu, J., Cui, M., Lv, D., Liu, C., Zhuang, G., 2013. Ascomycota Members Dominate Fungal Communities during Straw Residue Decomposition in Arable Soil. *PLOS ONE* 8, e66146.
- Ma, S., Baldocchi, D.D., Hatala, J.A., Detto, M., Curiel Yuste, J., 2012. Are rain-induced ecosystem respiration pulses enhanced by legacies of antecedent photodegradation in semi-arid environments? *Agricultural and Forest Meteorology* 154-155, 203-213.
- MAGRAMA, 2007. Tercer Inventario Forestal Nacional (IFN3), In: Ministerio de Agricultura, A.y.M.A. (Ed.), Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Spain.
- Magurran, A., 1988. *Ecological Diversity and Its Measurement*, pp. 7-45.
- Mariotti, A., Pan, Y., Zeng, N., Alessandri, A., 2015. Long-term climate change in the Mediterranean region in the midst of decadal variability. *Climate Dynamics* 44, 1437-1456.
- Martín González, A.M., Dalsgaard, B., Olesen, J.M., 2010. Centrality measures and the importance of generalist species in pollination networks. *Ecological Complexity* 7, 36-43.
- Martínez, Á.T., Speranza, M., Ruiz-Dueñas, F.J., Ferreira, P., Camarero, S., Guillén, F., Martínez, M.J., Gutiérrez, A., Río, J.C.d., 2005. Biodegradation of lignocelluloses: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International Microbiology* 8, 195-204.
- Martinez-Garcia, M., Brazel, D.M., Swan, B.K., Arnosti, C., Chain, P.S.G., Reitenga, K.G., Xie, G., Poulton, N.J., Gomez, M.L., Masland, D.E.D., Thompson, B., Bellows, W.K., Ziervogel, K., Lo, C.-C., Ahmed, S., Gleasner, C.D., Detter, C.J., Stepanauskas, R., 2012. Capturing Single Cell Genomes of Active Polysaccharide Degradors: An Unexpected Contribution of Verrucomicrobia. *PLOS ONE* 7, e35314.
- McDowell, N.G., Michaletz, S.T., Bennett, K.E., Solander, K.C., Xu, C., Maxwell, R.M., Middleton, R.S., 2018. Predicting Chronic Climate-Driven Disturbances and Their Mitigation. *Trends in Ecology & Evolution* 33, 15-27.



## BIBLIOGRAFÍA

McKenzie, N.J., Jacquier, D.J., Isbell, R.F., Brown, K.L., 2004. Australian Soils and Landscapes An Illustrated Compendium. CSIRO Publishing, Collingwood, Victoria.

McMurdie, P.J., Holmes, S., 2013. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. PLoS ONE 8, e61217.

Medina, N.G., Lara, F., Mazimpaka, V., Albertos, B., Alonso, I., Hortal, J., 2015. Epiphytic bryophytes of *Quercus* forests in Central and North inland Iberian Peninsula. *Frontiers of Biogeography* 7, 21-28.

Meinshausen, N., Buhlmann, P., 2006. High-dimensional graphs and variable selection with the Lasso. *Ann. Statist.* 34, 1436-1462.

Min, B.R., Gurung, N., Shange, R., Solaiman, S., 2019. Potential role of rumen microbiota in altering average daily gain and feed efficiency in meat goats fed simple and mixed pastures using bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing. *Journal of Animal Science* 97, 3523-3534.

Mitchell, J.F.B., 1989. The "Greenhouse" effect and climate change. *Reviews of Geophysics* 27, 115-139.

Mitrovica, J.X., Tamisiea, M.E., Davis, J.L., Milne, G.A., 2001. Recent mass balance of polar ice sheets inferred from patterns of global sea-level change. *Nature* 409, 1026-1029.

Moreno, G., Pulido, F.J., 2009. The Functioning, Management and Persistence of Dehesas, In: Rigueiro-Rodríguez, A., McAdam, J., Mosquera-Losada, M.R. (Eds.), *Agroforestry in Europe: Current Status and Future Prospects*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 127-160.

Moreno-Jiménez, E., Plaza, C., Saiz, H., Manzano, R., Flagmeier, M., Maestre, F.T., 2019. Aridity and reduced soil micronutrient availability in global drylands. *Nature Sustainability*.

Mori, T., Wachrinrat, C., Staporn, D., Meunpong, P., Suebsai, W., Matsubara, K., Boonsri, K., Lumban, W., Kuawong, M., Phukdee, T., Srifai, J., Boonman, K., 2017. Effects of phosphorus addition on nitrogen cycle and fluxes of N<sub>2</sub>O and CH<sub>4</sub> in tropical tree plantation soils in Thailand. *Agriculture and Natural Resources* 51, 91-95.

Morse, J.L., Durán, J., Beall, F., Enanga, E.M., Creed, I.F., Fernandez, I., Groffman, P.M., 2015. Soil denitrification fluxes from three northeastern North American forests across a range of nitrogen deposition. *Oecologia* 177, 17-27.

Moyano, F.E., Vasilyeva, N., Bouckaert, L., Cook, F., Craine, J., Curiel Yuste, J., Don, A., Epron, D., Formanek, P., Franzluebbers, A., Ilstedt, U., Kätterer, T., Orchard, V., Reichstein, M., Rey, A., Ruamps, L., Subke, J.A., Thomsen, I.K., Chenu, C., 2012. The moisture response of soil heterotrophic respiration: interaction with soil properties. *Biogeosciences* 9, 1173-1182.

Murty, D., Kirschbaum, M.U.F., McMurtrie, R.E., McGilvray, H., 2002. Does conversion of forest to agricultural land change soil carbon and nitrogen? a review of the literature. *Global Change Biology* 8, 105-123.

Navarro Cerrillo, R.M., Fragueiro, B., Ceaceros, C., del Campo, A., de Prado, R., 2005. Establishment of *Quercus ilex* L. subsp. *ballota* [Desf.] Samp. using different weed control strategies in southern Spain. *Ecological Engineering* 25, 332-342.

Navarro-Cerrillo, R.M., Sánchez-Salguero, R., Rodriguez, C., Duque Lazo, J., Moreno-Rojas, J.M., Palacios-Rodriguez, G., Camarero, J.J., 2019. Is thinning an alternative when trees could die in response to drought? The case of planted *Pinus nigra* and *P. Sylvestris* stands in southern Spain. *Forest Ecology and Management* 433, 313-324.

Nave, L.E., Gough, C.M., Maurer, K.D., Bohrer, G., Hardiman, B.S., Le Moine, J., Munoz, A.B., Nadelhoffer, K.J., Sparks, J.P., Strahm, B.D., Vogel, C.S., Curtis, P.S., 2011. Disturbance and the resilience of coupled carbon and nitrogen cycling in a north temperate forest. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences* 116.

Nguyen, N.H., Song, Z., Bates, S.T., Branco, S., Tedersoo, L., Menke, J., Schilling, J.S., Kennedy, P.G., 2016. FUNGuild: An open annotation tool for parsing fungal community datasets by ecological guild. *Fungal Ecology* 20, 241-248.

Nilsson, R.H., Larsson, K.-H., Taylor, A.F.S., Bengtsson-Palme, J., Jeppesen, T.S., Schigel, D., Kennedy, P., Picard, K., Glöckner, F.O., Tedersoo, L., Saar, I., Kõljalg, U., Abarenkov, K., 2018. The UNITE database for molecular identification of fungi: handling dark taxa and parallel taxonomic classifications. *Nucleic Acids Research* 47, D259-D264.

Norman, J.S., Barrett, J.E., 2014. Substrate and nutrient limitation of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in temperate forest soil. *Soil Biology and Biochemistry* 69, 141-146.

Oenema, O., Wrage, N., Velthof, G.L., van Groenigen, J.W., Dolfing, J., Kuikman, P.J., 2005. Trends in Global Nitrous Oxide Emissions from Animal Production Systems. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 72, 51-65.

Oki, T., Kanae, S., 2006. Global Hydrological Cycles and World Water Resources. *Science* 313, 1068.

Oksanen, J., Blanchet, F.G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlinn, D., Minchin, P.R., O'Hara, R.B., Simpson, G.L., Solymos, P., Stevens, M.H., Szoecs, E., Wagner, E., 2019. *vegan: Community Ecology Package*. R package version 2.5-4.

Olivar, J., Bogino, S., Rathgeber, C., Bonnesoeur, V., Bravo, F., 2014. Thinning has a positive effect on growth dynamics and growth-climate relationships in Aleppo pine (*Pinus halepensis*) trees of different crown classes. *Annals of Forest Science* 71, 395-404.

Parada, A.E., Needham, D.M., Fuhrman, J.A., 2016. Every base matters: assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples. *Environmental Microbiology* 18, 1403-1414.

Pascual, N., Ranjard, L., Kaisermann, A., Bachar, D., Christen, R., Terrat, S., Mathieu, O., Lévêque, J., Mougel, C., Henault, C., Lemanceau, P., Péan, M., Boiry, S., Fontaine, S., Maron, P.-A., 2013. Stimulation of Different Functional Groups of Bacteria by Various Plant Residues as a Driver of Soil Priming Effect. *Ecosystems* 16, 810-822.

Paterson, E., 2003. Importance of rhizodeposition in the coupling of plant and microbial productivity. *European Journal of Soil Science* 54, 741-750.

Penuelas, J., Sardans, J., Alcaniz, J.M., Poch, J.M., 2009. Increased eutrophication and nutrient imbalances in the agricultural soil of NE Catalonia, Spain. *J Environ Biol* 30, 841-846.

Petersen, I.A.B., Meyer, K.M., Bohannan, B.J.M., 2019. Consistent bacterial responses to land use change across the tropics. *bioRxiv*, 600924.

Picone, C., 2000. Diversity and Abundance of Arbuscular-Mycorrhizal Fungus Spores in Tropical Forest and Pasture1. *Biotropica* 32, 734-750.

Pietramellara, G., Ascher, J., Ceccherini, M.T., Renella, G., 2002. Soil as a Biological System. *Annals of Microbiology* 52, 119-132.

## BIBLIOGRAFÍA

- Pimentel, D., Kounang, N., 1998. Ecology of Soil Erosion in Ecosystems. *Ecosystems* 1, 416-426.
- Pinheiro, J., Bates, D., DebRoy, S., Sarkar, D., R Core Team, 2017. nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. R package version 3.1-131.
- Prober, S.M., Leff, J.W., Bates, S.T., Borer, E.T., Firn, J., Harpole, W.S., Lind, E.M., Seabloom, E.W., Adler, P.B., Bakker, J.D., Cleland, E.E., DeCrappeo, N.M., DeLorenze, E., Hagenah, N., Hautier, Y., Hofmockel, K.S., Kirkman, K.P., Knops, J.M.H., La Pierre, K.J., MacDougall, A.S., McCulley, R.L., Mitchell, C.E., Risch, A.C., Schuetz, M., Stevens, C.J., Williams, R.J., Fierer, N., 2015. Plant diversity predicts beta but not alpha diversity of soil microbes across grasslands worldwide. *Ecology Letters* 18, 85-95.
- Prosser, J.I., Nicol, G.W., 2012. Archaeal and bacterial ammonia-oxidisers in soil: the quest for niche specialisation and differentiation. *Trends in Microbiology* 20, 523-531.
- Pulido, F., McCreary, D., Cañellas, I., McClaran, M., Plieninger, T., 2013. Oak Regeneration: Ecological Dynamics and Restoration Techniques, In: Campos, P., Huntsinger, L., Oviedo Pro, J.L., Starrs, P.F., Diaz, M., Standiford, R.B., Montero, G. (Eds.), *Mediterranean Oak Woodland Working Landscapes: Dehesas of Spain and Ranchlands of California*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 123-144.
- Pulido, F., Picardo, A., Campos, P., Carranza, J., Coletto, J., Díaz, M., Diéguez, E., Escudero, A., Ezquerro, F., Fernández, P., Solla, A., 2010. Libro Verde de la Dehesa. Junta de Castilla y León, SECF, SEEP, AEET, SEO.
- Purahong, W., Wubet, T., Lentendu, G., Schlöter, M., Pecyna, M.J., Kapturska, D., Hofrichter, M., Krüger, D., Buscot, F., 2016. Life in leaf litter: novel insights into community dynamics of bacteria and fungi during litter decomposition. *Molecular Ecology* 25, 4059-4074.
- R Core Team, 2016. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Ramirez, K.S., Geisen, S., Morriën, E., Snoek, B.L., van der Putten, W.H., 2018. Network Analyses Can Advance Above-Belowground Ecology. *Trends in Plant Science* 23, 759-768.
- Rat, P., 1982. Factores condicionantes en el Cretácico de España. *Cuadernos de Geología Ibérica* 8, 1059-1076.
- Richardson, A.E., Barea, J.-M., McNeill, A.M., Prigent-Combaret, C., 2009. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant and Soil* 321, 305-339.
- Roberts, D.W., 2007. labdsv: Ordination and multivariate analysis for ecology. R package version 1.
- Robertson, G.P., Groffman, P.M., 2015. Chapter 14 - Nitrogen Transformations, In: Paul, E.A. (Ed.), *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry (Fourth Edition)*. Academic Press, Boston, pp. 421-446.
- Robock, A., 2000. Volcanic eruptions and climate. *Reviews of Geophysics* 38, 191-219.
- Rocha, G.P.E., Vieira, D.L.M., Simon, M.F., 2016. Fast natural regeneration in abandoned pastures in southern Amazonia. *Forest Ecology and Management* 370, 93-101.
- Rodríguez, A., Curiel Yuste, J., Rey, A., Durán, J., García-Camacho, R., Gallardo, A., Valladares, F., 2017. Holm oak decline triggers changes in plant succession and microbial communities, with implications for ecosystem C and N cycling. *Plant and Soil* 414, 247-263.

- Rodríguez, A., Durán, J., Rey, A., Boudouris, I., Valladares, F., Gallardo, A., Curiel Yuste, J., 2019. Interactive effects of forest die-off and drying-rewetting cycles on C and N mineralization. *Geoderma* 333, 81-89.
- Rodríguez-Calcerrada, J., Salomón, R., Barba, J., Gordaliza, G.G., Curiel Yuste, J., Magro, C., Gil, L., 2019. Regeneration in the Understory of Declining Overstory Trees Contributes to Soil Respiration Homeostasis along Succession in a Sub-Mediterranean Beech Forest. *Forests* 10.
- Rolim, S.G., Sambuichi, R.H.R., Schroth, G., Nascimento, M.T., Gomes, J.M.L., 2017. Recovery of Forest and Phylogenetic Structure in Abandoned Cocoa Agroforestry in the Atlantic Forest of Brazil. *Environmental Management* 59, 410-418.
- Romero-Díaz, A., Ruiz-Sinoga, J.D., Robledano-Aymerich, F., Brevik, E.C., Cerdà, A., 2017. Ecosystem responses to land abandonment in Western Mediterranean Mountains. *CATENA* 149, 824-835.
- Rousk, J., Bååth, E., Brookes, P.C., Lauber, C.L., Lozupone, C., Caporaso, J.G., Knight, R., Fierer, N., 2010. Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *The ISME Journal* 4, 1340-1351.
- Rousk, J., Brookes, P.C., Bååth, E., 2009. Contrasting Soil pH Effects on Fungal and Bacterial Growth Suggest Functional Redundancy in Carbon Mineralization. *Appl Environ Microbiol* 75, 1589.
- Ruiz-Dueñas, F.J., Martínez, A.T., 2009. Microbial degradation of lignin: how a bulky recalcitrant polymer is efficiently recycled in nature and how we can take advantage of this. *Microbial biotechnology* 2, 164-177.
- Sanauallah, M., Chabbi, A., Girardin, C., Durand, J.-L., Poirier, M., Rumpel, C., 2014. Effects of drought and elevated temperature on biochemical composition of forage plants and their impact on carbon storage in grassland soil. *Plant and Soil* 374, 767-778.
- Sardans, J., Peñuelas, J., 2005. Drought decreases soil enzyme activity in a Mediterranean *Quercus ilex* L. forest. *Soil Biology and Biochemistry* 37, 455-461.
- Sardans, J., Peñuelas, J., 2013. Plant-soil interactions in Mediterranean forest and shrublands: impacts of climatic change. *Plant and Soil* 365, 1-33.
- Sardans, J., Peñuelas, J., Estiarte, M., 2006. Warming and drought alter soil phosphatase activity and soil P availability in a Mediterranean shrubland. *Plant and Soil* 289, 227-238.
- Sardans, J., Rodà, F., Peñuelas, J., 2004. Phosphorus limitation and competitive capacities of *Pinus halepensis* and *Quercus ilex* subsp. *rotundifolia* on different soils. *Plant Ecology* 174, 307.
- Sato, H., Tanabe, A.S., Toju, H., 2015. Contrasting diversity and host association of ectomycorrhizal basidiomycetes versus root-associated ascomycetes in a dipterocarp rainforest. *PLOS ONE* 10, e0125550-e0125550.
- Saunders, M., Tobin, B., Black, K., Gioria, M., Nieuwenhuis, M., Osborne, B.A., 2012. Thinning effects on the net ecosystem carbon exchange of a Sitka spruce forest are temperature-dependent. *Agricultural and Forest Meteorology* 157, 1-10.
- Saura-Mas, S., Bonas, A., Lloret, F., 2015. Plant community response to drought-induced canopy defoliation in a Mediterranean *Quercus ilex* forest. *European Journal of Forest Research* 134, 261-272.

## BIBLIOGRAFÍA

Schmidt, P.-A., Bálint, M., Greshake, B., Bandow, C., Römbke, J., Schmitt, I., 2013. Illumina metabarcoding of a soil fungal community. *Soil Biology and Biochemistry* 65, 128-132.

Simard, S.W., Beiler, K.J., Bingham, M.A., Deslippe, J.R., Philip, L.J., Teste, F.P., 2012. Mycorrhizal networks: Mechanisms, ecology and modelling. *Fungal Biology Reviews* 26, 39-60.

Smith, P., House, J.I., Bustamante, M., Sobocká, J., Harper, R., Pan, G., West, P.C., Clark, J.M., Adhya, T., Rumpel, C., Paustian, K., Kuikman, P., Cotrufo, M.F., Elliott, J.A., McDowell, R., Griffiths, R.I., Asakawa, S., Bondeau, A., Jain, A.K., Meersmans, J., Pugh, T.A.M., 2016. Global change pressures on soils from land use and management. *Global Change Biology* 22, 1008-1028.

Smolders, A.J.P., Lucassen, E.C.H.E.T., Bobbink, R., Roelofs, J.G.M., Lamers, L.P.M., 2010. How nitrate leaching from agricultural lands provokes phosphate eutrophication in groundwater fed wetlands: the sulphur bridge. *Biogeochemistry* 98, 1-7.

Solly, E.F., Schöning, I., Boch, S., Kandeler, E., Marhan, S., Michalzik, B., Müller, J., Zscheischler, J., Trumbore, S.E., Schrumpf, M., 2014. Factors controlling decomposition rates of fine root litter in temperate forests and grasslands. *Plant and Soil* 382, 203-218.

Spohn, M., Widdig, M., 2017. Turnover of carbon and phosphorus in the microbial biomass depending on phosphorus availability. *Soil Biology and Biochemistry* 113, 53-59.

Spring, S., Bunk, B., Spröer, C., Schumann, P., Rohde, M., Tindall, B.J., Klenk, H.-P., 2016. Characterization of the first cultured representative of Verrucomicrobia subdivision 5 indicates the proposal of a novel phylum. *The ISME Journal* 10, 2801-2816.

Stark, C.H., Richards, K.G., 2008. The continuing challenge of nitrogen loss to the environment: Environmental consequences and mitigation strategies. *Dynamic Soil, Dynamic Plant* 2, 41-55.

Steele, J.A., Countway, P.D., Xia, L., Vigil, P.D., Beman, J.M., Kim, D.Y., Chow, C.-E.T., Sachdeva, R., Jones, A.C., Schwalbach, M.S., Rose, J.M., Hewson, I., Patel, A., Sun, F., Caron, D.A., Fuhrman, J.A., 2011. Marine bacterial, archaeal and protistan association networks reveal ecological linkages. *The ISME Journal* 5, 1414.

Stein, L.Y., Klotz, M.G., 2016. The nitrogen cycle. *Current Biology* 26, R94-R98.

Štursová, M., Šnajdr, J., Cajthaml, T., Bárta, J., Šantrůčková, H., Baldrian, P., 2014. When the forest dies: the response of forest soil fungi to a bark beetle-induced tree dieback. *The ISME Journal* 8, 1920-1931.

Szoboszlay, M., Dohrmann, A.B., Poeplau, C., Don, A., Tebbe, C.C., 2017. Impact of land-use change and soil organic carbon quality on microbial diversity in soils across Europe. *FEMS Microbiol Ecol* 93.

Tang, J., Baldocchi, D.D., 2005. Spatial-temporal variation in soil respiration in an oak-grass savanna ecosystem in California and its partitioning into autotrophic and heterotrophic components. *Biogeochemistry* 73, 183-207.

Tárrega, R., Calvo, L., Taboada, Á., García-Tejero, S., Marcos, E., 2009. Abandonment and management in Spanish dehesa systems: Effects on soil features and plant species richness and composition. *Forest Ecology and Management* 257, 731-738.

Tedersoo, L., May, T.W., Smith, M.E., 2010. Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: global diversity, distribution, and evolution of phylogenetic lineages. *Mycorrhiza* 20, 217-263.

Tedersoo, L., Smith, M.E., 2013. Lineages of ectomycorrhizal fungi revisited: Foraging strategies and novel lineages revealed by sequences from belowground. *Fungal Biology Reviews* 27, 83-99.

Thilakarathna, M.S., McElroy, M.S., Chapagain, T., Papadopoulos, Y.A., Raizada, M.N., 2016. Belowground nitrogen transfer from legumes to non-legumes under managed herbaceous cropping systems. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 36, 58.

Tian, J.-H., Pourcher, A.-M., Bouchez, T., Gelhaye, E., Peu, P., 2014. Occurrence of lignin degradation genotypes and phenotypes among prokaryotes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98, 9527-9544.

Tripathi, B.M., Stegen, J.C., Kim, M., Dong, K., Adams, J.M., Lee, Y.K., 2018. Soil pH mediates the balance between stochastic and deterministic assembly of bacteria. *The ISME Journal* 12, 1072-1083.

Trivedi, P., Delgado-Baquerizo, M., Jeffries, T.C., Trivedi, C., Anderson, I.C., Lai, K., McNee, M., Flower, K., Pal Singh, B., Minkey, D., Singh, B.K., 2017. Soil aggregation and associated microbial communities modify the impact of agricultural management on carbon content. *Environmental Microbiology* 19, 3070-3086.

Trumbore, S., 2006. Carbon respired by terrestrial ecosystems – recent progress and challenges. *Global Change Biology* 12, 141-153.

Urcelay, C., Díaz, S., Gurrich, D.E., Chapin III, F.S., Cuevas, E., Domínguez, L.S., 2009. Mycorrhizal community resilience in response to experimental plant functional type removals in a woody ecosystem. *Journal of Ecology* 97, 1291-1301.

Valencia, E., Gross, N., Quero, J.L., Carmona, C.P., Ochoa, V., Gozalo, B., Delgado-Baquerizo, M., Dumack, K., Hamonts, K., Singh, B.K., Bonkowski, M., Maestre, F.T., 2018. Cascading effects from plants to soil microorganisms explain how plant species richness and simulated climate change affect soil multifunctionality. *Global Change Biology* 24, 5642-5654.

Van Der Heijden, M.G.A., Bardgett, R.D., Van Straalen, N.M., 2008. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology Letters* 11, 296-310.

Van Der Heijden, M.G.A., Horton, T.R., 2009. Socialism in soil? The importance of mycorrhizal fungal networks for facilitation in natural ecosystems. *Journal of Ecology* 97, 1139-1150.

Vargas, R., Sánchez-Cañete P, E., Serrano-Ortiz, P., Curiel Yuste, J., Domingo, F., López-Ballesteros, A., Oyonarte, C., 2018. Hot-Moments of Soil CO<sub>2</sub> Efflux in a Water-Limited Grassland. *Soil Systems* 2.

Vessey, J.K., Pawlowski, K., Bergman, B., 2005. Root-based N<sub>2</sub>-fixing symbioses: Legumes, actinorhizal plants, *Parasponia* sp. and cycads. *Plant and Soil* 266, 205-230.

Vilà, M., Sardans, J., 1999. Plant competition in mediterranean-type vegetation. *Journal of Vegetation Science* 10, 281-294.

Vilà-Cabrera, A., Martínez-Vilalta, J., Galiano, L., Retana, J., 2013. Patterns of Forest Decline and Regeneration Across Scots Pine Populations. *Ecosystems* 16, 323-335.

Villar-Salvador, P., Nicolás Peragón, J.L., Heredia Guerrero, N., Uscola, M., 2013. *Quercus ilex* L, Producción y Manejo de Semillas y Plantas Forestales. Organismo Autónomo Parques Nacionales, pp. 226-250.

Violi, H.A., Barrientos-Priego, A.F., Wright, S.F., Escamilla-Prado, E., Morton, J.B., Menge, J.A., Lovatt, C.J., 2008. Disturbance changes arbuscular mycorrhizal fungal phenology and soil glomalin concentrations but not fungal spore composition in montane rainforests in Veracruz and Chiapas, Mexico. *Forest Ecology and Management* 254, 276-290.

## BIBLIOGRAFÍA

von Lützow, M., Kögel-Knabner, I., Ludwig, B., Matzner, E., Flessa, H., Ekschmitt, K., Guggenberger, G., Marschner, B., Kalbitz, K., 2008. Stabilization mechanisms of organic matter in four temperate soils: Development and application of a conceptual model. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 171, 111-124.

Voříšková, J., Baldrian, P., 2013. Fungal community on decomposing leaf litter undergoes rapid successional changes. *The ISME Journal* 7, 477-486.

Wang, X., Sharp, C.E., Jones, G.M., Grasby, S.E., Brady, A.L., Dunfield, P.F., 2015. Stable-Isotope Probing Identifies Uncultured Planctomycetes as Primary Degradors of a Complex Heteropolysaccharide in Soil. *Appl Environ Microbiol* 81, 4607.

Wei, X., Shao, M., Gale, W., Li, L., 2014. Global pattern of soil carbon losses due to the conversion of forests to agricultural land. *Scientific Reports* 4, 4062.

Wu, R., Cheng, X., Han, H., 2019. The Effect of Forest Thinning on Soil Microbial Community Structure and Function. *Forests* 10, 352.

Xiong, Y., D'Atri, J.J., Fu, S., Xia, H., Seastedt, T.R., 2011. Rapid soil organic matter loss from forest dieback in a subalpine coniferous ecosystem. *Soil Biology and Biochemistry* 43, 2450-2456.

Xu, Z., Jiang, Y., Zhou, G., 2016. Nitrogen cycles in terrestrial ecosystems: climate change impacts and mitigation. *Environmental Reviews* 24, 132-143.

Yan, J., Wang, L., Hu, Y., Tsang, Y.F., Zhang, Y., Wu, J., Fu, X., Sun, Y., 2018. Plant litter composition selects different soil microbial structures and in turn drives different litter decomposition pattern and soil carbon sequestration capability. *Geoderma* 319, 194-203.

Ye, J.-S., Bradford, M.A., Dacal, M., Maestre, F.T., García-Palacios, P., 2019. Increasing microbial carbon use efficiency with warming predicts soil heterotrophic respiration globally. *Global Change Biology* 25, 3354-3364.

Zamora, R., Gómez, J.M., Hódar, J.A., Castro, J., García, D., 2001. Effect of browsing by ungulates on sapling growth of Scots pine in a Mediterranean environment: consequences for forest regeneration. *Forest Ecology and Management* 144, 33-42.

Zhang, H., Zhou, Z., 2018. Recalcitrant carbon controls the magnitude of soil organic matter mineralization in temperate forests of northern China. *Forest Ecosystems* 5, 17.

Zhang, L.-M., Hu, H.-W., Shen, J.-P., He, J.-Z., 2011. Ammonia-oxidizing archaea have more important role than ammonia-oxidizing bacteria in ammonia oxidation of strongly acidic soils. *The Isme Journal* 6, 1032.

Zhao, W.Z., Xiao, H.L., Liu, Z.M., Li, J., 2005. Soil degradation and restoration as affected by land use change in the semiarid Bashang area, northern China. *CATENA* 59, 173-186.

Zornoza, R., Guerrero, C., Mataix-Solera, J., Scow, K.M., Arcenegui, V., Mataix-Beneyto, J., 2009. Changes in soil microbial community structure following the abandonment of agricultural terraces in mountainous areas of Eastern Spain. *Applied Soil Ecology* 42, 315-323.

Zuur, A.F., Ieno, E.N., Elphick, C.S., 2010. A protocol for data exploration to avoid common statistical problems. *Methods in Ecology and Evolution* 1, 3-14.